

Hat das pankreatische Renin-Angiotensin-Aldosteron-System  
einen Einfluss auf die Betazellreserve bei erwachsenen  
Patienten mit Typ 1 Diabetes?

**Inauguraldissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Wöhrle, Annelie Isabel  
aus Rheinfelden

Gießen (2017)

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III,  
unter der Leitung von Prof. Dr. Andreas Schäffler,  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. Philip D. Hardt
2. Gutachter: Prof. Dr. Klaus-Peter Zimmer

Tag der Disputation: 05.11.2018

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	72
2. Ziel der Studie.....	73
3. Literaturübersicht.....	73
3.1 Das Pankreas.....	73
3.1.1 Endokrines Pankreas .....	74
3.2 Diabetes mellitus .....	78
3.2.1 Allgemeines, Einteilung, Epidemiologie .....	78
3.2.2 Pathogenese.....	79
3.2.2.1 Diabetes mellitus Typ 1.....	79
3.2.3 Klinik .....	81
3.2.3.1 Diagnose .....	82
3.2.3.2 Verlaufsbeurteilung.....	83
3.2.4 Folgeerkrankungen.....	83
3.2.4.1 Mikroangiopathien .....	83
3.2.4.2 Makroangiopathien.....	85
3.2.4.3 Das diabetische Fuß-Syndrom.....	85
3.2.5 Therapie.....	86
3.2.6 Glukagon und Diabetes mellitus .....	88
3.3 Das RAAS .....	89
3.3.1 Das systemische Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) .....	89
3.3.2 Das lokale RAAS .....	91
3.3.2.1 Das lokale Renin-Angiotensin-System (RAAS) des exokrinen Pankreas .....	92
3.3.2.2 Das lokale RAAS des endokrinen Pankreas .....	92
3.3.2.3 Das lokale RAAS in Zusammenhang mit dem Diabetes mellitus Typ 2.....	94
3.3.2.4 Das lokale RAAS in Zusammenhang mit dem Diabetes mellitus Typ 1.....	100
3.4 Bedeutung des Angiotensin-Converting Enzyms und des I/D Polymorphismus.....	101
3.4.1 Struktur und Funktionen des Angiotensin-Converting Enzyms.....	101
3.4.2 Die Bedeutung des I/D Polymorphismus.....	102
3.4.3 Die medikamentöse Blockade des RAAS durch ACE-Hemmer und ATII-Blocker .....	105
4. Material und Methoden .....	106
4.1 Studienaufbau und Patientenkollektive .....	106
4.2 Datenerhebung .....	107

4.2.1 Gruppe 1.....	107
4.2.1.1 Labordiagnostik .....	107
4.2.1.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zur Bestimmung der I/D-Polymorphismen des ACE-Gen .....	109
4.2.1.3 Weitere Daten .....	115
4.2.2 Gruppe 2.....	115
4.2.2.1 Labordiagnostik .....	115
4.2.2.2 Weitere Daten .....	116
4.3 Statistische Analyse .....	116
5. Ergebnisse .....	117
5.1. Gruppe 1a.....	117
5.1.1. Deskriptive Statistik .....	117
5.1.2 Vergleiche und Korrelationen .....	120
5.1.2 Gruppe 1b.....	124
5.1.2.1 Deskriptive Statistik .....	124
5.1.2.2 Vergleiche und Korrelationen .....	127
5.2 Kontrollgruppe.....	128
12 Nichtdiabetiker bilden die Vergleichsgruppe.....	128
5.2.1 Deskriptive Statistik .....	128
5.2.1.1 Alter .....	128
5.2.1.2 Geschlecht .....	128
5.2.1.3 HbA1c .....	128
5.2.1.4 BMI .....	129
5.2.1.5 Glukagon .....	129
5.2.1.6 C-Peptid.....	129
5.2.1.7 ACE.....	129
5.2.1.8 Glukagon (pg/ml)/BZ(mg/dl) .....	129
5.2.1.9 I/D-Polymorphismen .....	130
5.4. Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse .....	132
6. Diskussion .....	132
6.1 Einfluss der ACE-Aktivität auf die Betazellfunktion im Verlauf eines Diabetes mellitus Typ 1 .....	132
6.2 Zusammenhänge zwischen der ACE-Aktivität und dem Glukagon-Wert .....	135
6.3 Verteilung der I/D-Polymorphismen .....	136
7. Zusammenfassung .....	139
8. Summary .....	140
9. Abkürzungsverzeichnis .....	141

10. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	144
11. Literaturverzeichnis .....	146
12. Puplicationsverzeichnis.....	72
13. Erklärung zur Dissertation .....	72
14. Danksagung .....	73

# 1. Einleitung

Die autoimmune Zerstörung der pankreatischen Betazellen verläuft zeitlich und graduell bei erwachsenen Patienten mit Typ 1 Diabetes sehr unterschiedlich. Über die Ursache der interindividuellen Unterschiede in der Abnahme der Betazellreserve ist nur wenig bekannt. Eine Möglichkeit zu finden, die Betazellreserve so lange wie möglich zu erhalten, würde die Stoffwechseleinstellung vieler Typ 1 Diabetiker deutlich vereinfachen.

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist bekannt als ein im Blut zirkulierendes und systemisch wirkendes Hormonsystem. Besonders relevant ist sein Produkt Angiotensin II, welches Einfluss auf den Blutdruck nimmt und einen wichtigen Regulator des Wasser- und Elektrolythaushalts darstellt. Eine weitere Komponente ist das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE), welches aus Angiotensin I das Angiotensin II bildet und somit eine Schlüsselrolle im System spielt. Neuer sind die Erkenntnisse über die Existenz eines lokalen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. Dieses verfügt über entscheidende Komponenten des zirkulierenden Systems, welche lokal im Gewebe exprimiert werden und auch dort wirken. Neben einigen weiteren Organen wurden die Komponenten des lokalen RAAS im Pankreas nachgewiesen.

Im murinen Modell korrelierten höhere ACE-Werte mit der vermehrten Entwicklung einer Insulitis und Betazellzerstörung. Diese und andere Erkenntnisse bringen das lokale RAAS mit der Pathogenese des Typ 1 Diabetes mellitus in Zusammenhang. Eine im Verlauf der Erkrankung fortschreitende autoimmune Zerstörung der Betazellen könnte in Zukunft vielleicht durch eine medikamentöse Blockade des lokalen RAAS aufgehalten werden.

Nicht nur Insulin spielt eine Rolle im Verlauf eines Diabetes mellitus. Zunehmend wird auch die Relevanz einer Hyperglukagonämie im Krankheitsprozess untersucht.

Glukagon wird von den Alphazellen des endokrinen Pankreas sezerniert und erhöht den Blutzuckerspiegel. Durch Färbungen von Inselzell-Suspensionen konnte eine vorwiegende Lokalisation von AT1-Rezeptoren auf den Alphazellen nachgewiesen werden. Ein indirekter Einfluss des lokalen RAAS über die Alphazellen auf die Funktion der Betazellen ist ein möglicher Mechanismus.

Vergleicht man die ACE-Plasmaspiegel zwischen verschiedenen Individuen kann man große Unterschiede feststellen. Es wurde gezeigt, dass ungefähr 50% der phänotypischen Variabilität der Plasmawerte zwischen verschiedenen Individuen dem Insertions/Deletions-Polymorphismus zugeschrieben werden kann. Nicht nur für den ACE-Plasmaspiegel ist der I/D-Polymorphismus relevant, sondern auch für die Höhe der ACE-Aktivität im lokalen System.

## **2. Ziel der Studie**

Bei einem Patientenkollektiv mit Typ 1 Diabetikern wird der Einfluss der genetisch determinierten ACE-Aktivität auf den Verlauf der Betazellreserve untersucht. Die zentrale Frage ist hier, ob eine erhöhte ACE-Aktivität zu einer schnelleren Abnahme der Betazellfunktion im Laufe eines Typ 1 Diabetes führt.

Bei einem Teil dieser Patienten wird der Zusammenhang der ACE-Aktivität mit dem Glukagonspiegel untersucht. Hier stellt sich die Frage nach einem möglichen indirekten Einfluss des lokalen RAAS über den Glukagonspiegel auf die Betazellfunktion.

Zusätzlich wird die Verteilung des I/D-Polymorphismus und ein möglicher Zusammenhang mit dem Auftreten des Diabetes mellitus Typ 1 untersucht.

## **3. Literaturübersicht**

### **3.1 Das Pankreas**

Die Bauchspeicheldrüse entwickelt sich aus dem Epithel des Duodenums und ist zunächst auf eine dorsale und eine ventrale Pankreasanlage verteilt. Diese verschmelzen gegen Ende des 2. Embryonalmonats. Die dorsale Anlage bildet den Corpus und die Cauda pancreatis, aus der ventralen Anlage entsteht zusammen mit Teilen der dorsalen Anlage der Pankreaskopf.

Das Pankreas ist eine sekundär retroperitoneal im Oberbauch gelegene Drüse mit endokrinen und exokrinen Anteilen, wiegt ca 70-90 g und ist 14-18 cm lang. Der Pankreaskopf liegt in der C-förmigen Konkavität der Duodenalschleife, der Pankreaskörper zieht in Höhe von L1 und L2 über die Wirbelsäule nach links, überquert die Aorta und geht dann in den Pankreasschwanz über. Dieser erreicht das Milzhilum. Der ca. 2 mm dicke Ductus pancreaticus major verläuft durch die ganze Länge der

Drüse, sammelt dabei kleinere Zuflüsse und mündet zusammen mit dem Ductus choledochus auf der Papilla duodeni major des Pars descendes duodeni.

Das Pankreas ist in viele Läppchen aufgeteilt, die durch lockeres feinfaseriges Bindegewebe voneinander getrennt sind. Dieses Bindegewebe verdichtet sich an der Drüsenoberfläche zu einer dünnen Kapsel (Schiebler, Schmidt et al. 2002).

### **3.1.1 Endokrines Pankreas**

Das endokrine Pankreas macht nur ca 2 % der Masse des Pankreas aus und wird von den Langerhans-Inseln repräsentiert. Diese erhielten ihren Namen von Paul Langerhans, der sie 1869 erstmals in seiner Doktorarbeit beschrieb. Ihre endokrine Funktion wurde 1886 von Minkowski und Mehring entdeckt. Die Langerhans-Inseln sind zapfenförmig aus dem Epithel der embryonalen Ausführungsgänge und der Azini der dorsalen Anlage hervorgegangen (Schiebler, Schmidt et al. 2002). Sie haben einen Durchmesser von 100-200 µm und sind aus 2000-3000 Zellen verschiedenen Typs zusammengesetzt. Im Pankreas gibt es von ihnen 1-2 Millionen, wovon der größere Teil im Schwanzteil zu finden ist. Meist liegen sie in einem Pankreasläppchen, selten extralobulär (Welsch et al. 2003). Insgesamt lassen sich in den Inseln fünf verschiedene endokrine Zellen unterscheiden, die pankreatisches Polypeptid bildenden Zellen, Alpha-, Beta-, Delta- und Epsilonzellen. Die verschiedenen Zellen können sich durch parakrine Wirkungen gegenseitig beeinflussen (Golenhofen et al. 2000). Von der Anordnung her liegen die Alphazellen peripher und die Betazellen meist zentral.

Die Inseln sind reich vaskularisiert. Ein bis drei afferente Gefäße versorgen die Inseln, die sich in der Inselperipherie oder auch erst im Zentrum zu sinusoidalen fenestrierten Kapillaren aufspalten. Von den peripheren Kapillaren gehen zahlreiche abführende Gefäße aus, die sogenannten insuloazinären Portalgefäße, die in das Kapillarnetz der Azinuszellen einmünden. Damit wird den Azini hormonreiches Blut zugeführt, wodurch vermutlich die Sekretion der Azinuszellen beeinflusst wird. Das venöse Blut des Pankreas fließt in die V. portae und somit zunächst in die Leber. Die Pfortader hat daher immer einen höheren Gehalt an Inselhormonen als andere Gefäßabschnitte (Welsch et al. 2002).



**Alpha-Zellen:**

Ca 20% der Inselzellen sind Alphazellen, welche Glukagon produzieren (Golenhofen et al. 2000). Glukagon ist ein 29-Aminosäuren Polypeptid, das aus Proglukagon gebildet wird. Proglukagon wird im Darm und Hirnstamm gebildet (Bagger J.I. et al. 2011).

Glukagon ist der wichtigste Gegenspieler von Insulin, und der stärkste Reiz für seine Freisetzung ist die Abnahme des Blutzuckerspiegels. Gromada et al. beschreiben verschiedene Faktoren, die die Glukagonsekretion beeinflussen. So haben Insulin, Zink, GABA, Glutamat, Somatostatin, Ghrelin, GLP-1 und Glukagon selbst einen Einfluß. Weiter wird die Freisetzung vom autonomen Nervensystem beeinflusst (Gromada J. et al. 2007). Watts et al. schließen anhand ihrer Untersuchungen an einem mathematischen Inselmodel darauf, dass verschiedene Mechanismen zur Glukagonsuppression bei hohen Glukosewerten führen. Dies geschieht zum einen über Insulin und Somatostatin auf parakrinem Weg und über intrinsische Mechanismen der Alphazellen. Bei dem intrinsischen Weg spielen unter anderem ATP-sensitive Kaliumkanäle eine Rolle (Watts M. et al. 2016).

Moon et. al. fassen eine insulinantagonistische, also Blutzucker erhöhende Wirkung des Glukagons durch eine vermehrte Glykogenolyse und Gluconeogenese in der Leber sowie eine Förderung der Fettsäureoxidation und Ketogenese zusammen (Moon J.S., Won K.Ch. 2015).

**Beta-Zellen:**

Die Betazellen machen 70% der endokrinen Zellen im Pankreas aus und sind für die Produktion und Freisetzung von Insulin zuständig.

Mechanismus der Insulinsekretion:

Für den Mechanismus der Insulinsekretion spielen ATP-abhängige Kaliumkanäle eine entscheidende Rolle. Durch die steigenden Glukosekonzentrationen wird der Glukoseeinstrom in die Zelle gesteigert, wodurch der Energieumsatz und somit die ATP-Bildung gefördert wird. Die zunehmende ATP-Konzentration bewirkt die Schließung der ATP-abhängigen Kaliumkanäle. Dies führt zu Depolarisation und Eröffnung von potentialabhängigen Calcium-Kanälen. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen veranlassen über Exozytose der insulinhaltigen Vesikel die Hormonfreisetzung. (Golenhofen et al. 2000) Insulin entsteht aus Proinsulin, seinem Vorgängerprotein im Golgi-Komplex, indem den Beta-Granula ein sogenanntes connective peptide (C-Peptid) abgespalten

wird. Insulin bildet dann Hexamere, die in den Granula durch Zink stabilisiert werden. Die Hexamere zerfallen bei der Ausschleusung des Insulins in die Blutbahn.

Neben der Exozytose der insulinhaltigen Granula wird über den Anstieg des intrazellulären Calciums die Neusynthese von Insulin stimuliert. Somit kommt es zu einer Insulinausschüttung in zwei Phasen (Speckmann E.-J. et al. 2008).

Neben der durch Glukosereiz ausgelösten Insulinsekretion besteht eine basale Insulinsekretion mit einem Gipfel am frühen Morgen und am späten Nachmittag.

Auf die Insulinsekretion fördernd wirkende Faktoren sind die direkte, glukoseunabhängige Stimulierung der Betazelle durch bestimmte Aminosäuren (v.a. Leucin), Mannose und durch  $\beta$ -adrenerge Stimulation. Der Glukoseeffekt an der Betazelle wird verstärkt durch: gastrointestinale Hormone (gastric inhibitory peptide, Cholezystokinin, Sekretin, Gastrin), Aminosäuren (Arginin, Lysin), Fettsäuren, Ketonkörper, Acetylcholin (Vagusreiz) und Glucagon like peptide 1 aus dem Darm (GLP-1).

Auf die Insulinsekretion hemmend wirkende Faktoren sind Insulin über ein negatives Feedback, Noradrenalin, Adrenalin und anderweitige  $\alpha$ 2-adrenerge Stimulation sowie eine chronisch erhöhte Glukosekonzentration (Renz-Polster H., Krautzig S., Braun J. et al. 2004).

Wirkungen des Insulins:

Über Bindung des Insulins an den Zielzellen löst es eine Signaltransduktionskaskade aus, die unter anderem zu einer Translokation des Glukosetransporters GLUT-4 und damit zu einem Glukosetransport in die Zellen führt. Verschiedene intrazelluläre Proteine dienen als Substrate und werden durch Phosphorylierung aktiviert. Diese Proteine sind unter anderem IRS 1-4 (Insulinrezeptor-Substrat 1-4), PI-3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) und PBK (Proteinkinase B) (Speckmann E.-J. et al. 2008).

Insgesamt hat Insulin eine anabole, wachstumsfördernde und Katabolismus hemmende Wirkung im Stoffwechsel. Insulin wirkt auf erhöhte Blutglukosewerte durch Förderung der Glukoseaufnahme in Leber-, Fett- und Muskelzellen, Aktivierung der Glykogensynthese und Hemmung der Glukoneogenese senkend. Durch erhöhte Glykogensynthese und Lipogenese wird die Überführung der Glukose in seine

Speicherformen gefördert. Dabei wird gleichzeitig die Ketogenese und die Lipolyse gehemmt (Renz-Polster H., Krautzig S., Braun J. et al. 2004). Durch die Hemmung der Lipolyse im Fettgewebe reguliert Insulin die Konzentration der freien Fettsäuren (Zeyda M., Stulnig T.M. 2009). Ausserdem fördert es im Zuge seiner anabolen Wirkung die Proteinsynthese und hemmt die Proteinolyse.

#### **Delta-Zellen:**

10% der endokrinen Zellen im Pankreas sind Deltazellen. Sie bilden Somatostatin, dessen Sekretion durch viele metabolische Faktoren und Hormone gefördert wird. Somatostatin hemmt die Sekretion von Glukagon und Insulin (Renz-Polster H., Krautzig S., Braun J. et al. 2004).

#### **pp-Zellen:**

Pankreatisches Polypeptid sezernierende Zellen machen 1-2% der endokrinen Pankreaszellen aus. Sie befinden sich vor allem im Pankreaskopf, kommen einzeln aber auch in den Azini und Pankreasgängen vor (Welsch et al. 2002). Es hemmt die durch Sekretin stimulierte Sekretion des exokrinen Pankreas und schränkt die durch Gastrin stimulierte Magensäureproduktion ein (Schiebler, Schmidt et al. 2002).

Das endokrine und exokrine Pankreas lassen sich nicht als getrennte Bereiche verstehen. So zeigen Hayden et al. in ihren Untersuchungen, dass exokrine und endokrine Anteile strukturell und funktionell verbunden sind. Beide Anteile sind in eine interstitielle Matrix eingebettet, die wie eine Straßenkarte das gesamte Pankreas durchzieht. Hierüber sind Kommunikation und Austausch von Molekülen und Zellen möglich (Hayden M.R. et al. 2008).

## 3.2 Diabetes mellitus

### 3.2.1 Allgemeines, Einteilung, Epidemiologie

Der Diabetes mellitus ist eine Gruppe heterogener Erkrankungen (siehe Tab 1) mit dem gemeinsamen Merkmal der chronischen Hyperglykämie (Herold et al. 2016). Der „honigsüße Durchfluss“ erhielt seinen Namen aufgrund des süßlich schmeckenden Urins der Erkrankten. Dieser spielte im Altertum eine wesentliche Rolle in der Diagnostik. Der Diabetes mellitus hat seither nicht an Bedeutung verloren, sondern ist noch immer eine der häufigsten Krankheiten der Inneren Medizin. Die WHO schätzt weltweit 422 Millionen an Diabetes mellitus Erkrankungen bei Personen über 18 Jahren (WHO, 2016). Seit 1980 hat sich diese Zahl zusammen mit dem Bevölkerungswachstum und der Bevölkerungsalterung fast vervierfacht. Die weltweite altersstandartisierte Prävalenz stieg von 4,3% (1980) auf 9% (2014) bei Männern und von 5% auf 7,9% bei Frauen (NCD-RisC, 2016). Der Typ 2 Diabetes ist für über 90% der Diabetesfälle verantwortlich. Hier steht die Insulinresistenz des Muskel- und Fettgewebes im Vordergrund. Risikofaktoren für die Entstehung sind eine genetische Disposition, wobei Bewegungsmangel, Fehlernährung und Übergewicht hinzukommen. Die Zunahme dieser Risikofaktoren hat in den letzten Jahrzehnten zu einem starken Anstieg der Häufigkeit des Typ 2 Diabetes geführt. Aber nicht nur die Häufigkeit des Typ 2 Diabetes nimmt zu. Studien zeigen einen Anstieg der Inzidenz des Diabetes Typ 1 in allen Teilen der Welt. Der durchschnittliche Anstieg liegt bei 3-4% pro Jahr. Insgesamt wird das Manifestationsalter jünger. Die Ursachen für den Trend sind bisher noch unklar (Tuomilehto J. 2013).

Tab 1: Klassifikation des Diabetes mellitus nach Ätiologie (American Diabetes Association, 2011)

<b>I. Typ 1 Diabetes</b> (Betazell-Zerstörung, die üblicherweise zum absoluten Insulinmangel führt) A: Immunologisch vermittelt B: Idiopathisch
<b>II. Typ 2 Diabetes</b> (kann sich von einer vorwiegenden Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel bis zu einem vorwiegend sekretorischen Defekt mit Insulinresistenz erstrecken)

### **III.     Andere spezifische Diabetes-Typen**

A: Genetische Defekte der Betazell-Funktion

B: Genetische Defekte der Insulinwirkung

C: Erkrankungen des exokrinen Pankreas

D: Endokrinopathien

E: Medikamenten- oder chemikalieninduziert

F: Infektionen

G: seltene Formen des immunvermittelten Diabetes

H: Andere, gelegentlich mit Diabetes assoziierte genetische Syndrome

### **IV:     Gestationsdiabetes**

## **3.2.2 Pathogenese**

### **3.2.2.1 Diabetes mellitus Typ 1**

Der Diabetes mellitus Typ 1 ist durch einen absoluten Insulinmangel gekennzeichnet, der Folge einer Zerstörung der Betazellen der Langerhansschen Inseln ist. Das Manifestationsalter liegt meist zwischen dem 12. und 24. Lebensjahr (Herold et al. 2016). Unterscheiden kann man zwischen zwei pathogenetischen Wegen die zur Beta-Zellzerstörung führen können. Einmal der Typ 1a Diabetes mit einer immunologisch bedingten und dem in Europa seltenen Typ 1b Diabetes mit einer idiopathischen Zellzerstörung. Im Folgenden wird sich auf den Typ 1a bezogen. Für die Zerstörung der Betazellen wird hier ein autoimmuner Prozess verantwortlich gemacht. Für diesen Prozess gibt es verschiedene genetische Prädispositionen und vermutlich ein oder mehrere Umweltfaktoren als Trigger (Pietropaolo M. et al. 2015).

Ist ein Elternteil erkrankt liegt das Risiko für die Kinder bei Erkrankung des Vaters bei ca. 5% und bei der Erkrankung der Mutter bei 2,5%. Sind beide Elternteile erkrankt liegt das Risiko der Kinder bei 20%. Bei eineiigen Zwillingen haben die Geschwister ein Risiko von ca 35% zu erkranken (Herold et al. 2016). Von verschiedenen Gen-Polymorphismen wird ein Einfluss auf das Risiko an einem Diabetes Typ 1 zu erkranken beschrieben. Allele des humanen Leukozytenantigen-System (HLA) haben den größten Effekt, gefolgt von Polymorphismen der Insulingene und PTPN22 (Protein

tyrosine phosphatase) (Pietropaolo M. et al. 2015). HLA-identische Geschwister haben ein Risiko von ca 18%, dagegen haben HLA-verschiedene Geschwister kaum ein erhöhtes Risiko an Diabetes Typ 1 zu erkranken. Allgemein ist das Risiko zu erkranken bei dem Vorliegen des HLA-DR3 und DR4 um das 4-10 fache erhöht, > 90% der Erkrankten haben eines oder beide dieser Merkmale (Renz-Polster H., Krautzig S., Braun J. et al. 2004; Herold et al. 2016). Die Prävalenz dieser Gene variiert mit der ethnologischen Herkunft. Dies erklärt ein gehäuftes Vorkommen von Diabetes Typ 1 in Skandinavien und Sardinien und ein geringes Vorkommen in China (Pietropaolo M. et al. 2015). Die für den Diabetes Typ 1 relevanten Gene kodieren MHC-Klasse II Moleküle, die auf der Zelloberfläche von antigenpräsentierenden Zellen expremiert werden. Diese binden Antigene, die an der Pathogenese des Diabetes Typ 1 beteiligt sind und präsentieren diese gegenüber T-Zellen, die eine große Rolle in dem destruktiven autoimmunen Prozess spielen (Pietropaolo M. et al. 2015).

Ziel der autoimmunen Reaktion sind verschiedene pankreatische Antigene mit folgender Zerstörung der Betazellen. Zu Beginn eines Diabetes mellitus Typ 1 lassen sich Antikörper nachweisen, wie solche gegen Inselzellen (ICA-islet cell antibodies), die bei 60-80% der Erkrankten zum Zeitpunkt der Manifestation vorhanden sind. Glutaminsäuredecarboxylase-Antikörper (Anti-GAD-AK (GADA)) und Thyrosin-Phosphatase-Antikörper (IA-2A) sind zusammen bei > 90 % nachweisbar. Insulin-Autoantikörper (IAA) sind vor allem bei Kindern nachweisbar und haben eine geringere diagnostische Bedeutung. Mit dem Rückgang des akuten Immunprozesses sinkt die Nachweisbarkeit der Antikörper im Laufe der Jahre unter die Nachweisgrenze (Renz-Polster H., Krautzig S., Braun J. et al. 2004).

Als zugrundeliegender Mechanismus der Betazellzerstörung wird die Apoptose gesehen, welche durch die von Immunzellen produzierten Cytokine ausgelöst wird. Dies sind Cytokine wie IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  (Federici M. et al. 2001; Efanova I.B. et al. 1998 aus Donath M.Y. et al. 2003). Diskutiert wird auch, ob Betazellen an erster Stelle Chemokine wie MCP-1 und IP-10 produzieren, die dann zum Auftreten der Insulitis beitragen (Evans J.L. et al. 2003 aus Donath M.Y. et al. 2003).

Alle Inselzellen sind den gleichen inflammatorischen Faktoren ausgesetzt, aber die Betazellen sind besonders von der Zerstörung betroffen. Es gibt zwar Hinweise, dass z.B. die Alphazellen auch geschädigt werden, jedoch müssen die Betazellen eine angeborene Funktion haben, die sie besonders sensibel auf die Entzündungsmediatoren machen (Donath M. Y. et al. 2003).

Die Faktoren, die den Ausbruch der autoimmunen Insulitis triggern, sind noch unklar. Diskutiert wird u.a. der Einfluss von Viren wie z.B. Coxsackie B, Mumps, und Röteln im Rahmen des kongenitalen Rötelsyndroms sowie auch Toxine (Renz-Polster H., Krautzig S., Braun J. et al. 2004). Außerdem wird ein Einfluss von perinatalen Faktoren, Impfungen im Kindesalter, Kuhmilch, Getreide und Nitraten im Trinkwasser diskutiert, sowie ein protektiver Schutz von Vitamin-D und Omega-3-Fettsäuren (Pietropaolo M. et al. 2015).

### 3.2.3 Klinik

Die Manifestation des Diabetes mellitus Typ 1 kann sich auf verschiedene Arten darstellen.

- **Hyperglykämie ohne Azidose** mit Polyurie, Polydipsie und der Gewichtsverlust. Hinzu kommen Zeichen der Abwehrschwäche, wie vor allem bei Frauen häufige Mykosen und Sehstörungen.

- **Die diabetische Ketoazidose** ist die zweithäufigste klinische Manifestation bei Diagnosestellung. Steigen die Blutzuckerwerte auf ca > 350 mg/dl (Herold et al. 2016), aber meist nicht über 700 mg/dl (Renz-Polster H., Krautzig S., Braun J. et al. 2004), besteht beim Diabetes mellitus Typ 1 die große Gefahr des ketoazidotischen Komas. Auslöser sind häufig Infekte oder andere Zustände mit erhöhtem Insulinbedarf wie Operationen, Übelkeit und Erbrechen, die nicht durch eine exogene Insulinzufuhr ausgeglichen wurden. Durch den Insulinmangel wird die Glukoneogenese in der Leber verstärkt und die Glukoseutilisation der insulinsensitiven Organe vermindert. Die dadurch resultierende Hyperglykämie hat Folgen wie Polyurie mit Wasser- und Elektrolytverlusten, Polydipsie, und schließlich Exsikkose mit Bewusstseinsstörungen. Gleichzeitig ist durch den Insulinmangel die Lipolyse gesteigert. Aus den anfallenden langkettigen Fettsäuren werden Ketonkörper wie Azetazetat und  $\beta$ -Hydroxybutyrat gebildet, welche eine azidotische Stoffwechsellage erzeugen. Die Azidose bewirkt einen Austausch von extrazellulärem  $H^+$  gegen intrazelluläres Kalium. Trotz der renalen Kaliumverluste bleibt der extrazelluläre Spiegel deshalb normal bis sogar erhöht. Erst bei Normalisierung der azidotischen Lage und bei Normalisierung der Blutzuckerwerte kommt es dann zu Hypokaliämie. Die Azidose bewirkt auch ein Erbrechen, welches die Dehydratation und den Elektrolytmangel noch verstärkt. Typisch für das ketoazidotische Koma ist der Azetongeruch und die durch die Azidose

ausgelöste Kussmaulatemung. Auffällig kann es auch durch pseudoperitonistische Bauchschmerzen und Präkoma werden (Renz-Polster H., Krautzig S., Braun J. et al. 2004; Herold et al. 2016).

- **Die Diagnose ohne Symptome** ist selten und wird meist bei Kindern mit erkrankten Familienmitgliedern vor Symptombeginn durch regelmässige Blutglukosekontrollen gestellt.

### 3.2.3.1 Diagnose

Die Diagnose wird durch folgende Kriterien (siehe Tab 2) gestellt:

*Tab 2: Diagnosekriterien für einen Diabetes mellitus nach ADA (American Diabetes Association, 2011)*

1. HbA1c  $\geq 6,5\%$ . Der Test sollte in einem Labor durchgeführt werden, das eine NGSP zertifizierte Methode verwendet und für den DCCT-Assay standardisiert ist.\*

**oder**

2. Nüchternplasmaglukose  $\geq 126$  mg/dl (7,0 mmol/l). Nüchtern ist definiert durch keine Kalorienaufnahme seit mindestens acht Stunden.\*

**oder**

3. Zwei-Stunden-Plasmaglukose  $\geq 200$  mg/dl (11,1 mmol/l) während eines OGTT. Der OGTT sollte nach WHO-Kriterien durchgeführt werden.\*

**oder**

4. Bei einem Patient mit klassischen Symptomen einer Hyperglykämie oder einer hyperglykämischen Krise zeigt sich ein beliebiger Plasmaglukosewert  $\geq 200$  mg/dl (11,1 mmol/l).

NGSP: national glycohemoglobin standardization program

\*Liegt keine typische Hyperglykämie vor, sollten die Kriterien 1-3 durch Wiederholung bestätigt werden.

Zur Differenzierung zwischen Typ 1 und Typ 2 Diabetes müssen verschiedene Kriterien wie das Alter, der Körperhabitus, Zeichen der Insulinresistenz und die familiäre Geschichte berücksichtigt werden. Laborchemisch werden zusätzlich die bereits erwähnten Antikörper sowie die Höhe des C-Peptids bestimmt (Levitsky L.L. et al. 2015).



### **Oraler Glukosetoleranztest (OGTT):**

Der OGTT wird für die klinische Routine nicht empfohlen (Herold et al. 2016), sondern hat seinen Stellenwert bei unklaren Fällen und bei Schwangeren. Voraussetzung ist die Vermeidung eines Hungerzustandes in den letzten 3 Tagen, ein Nüchternzustand über 10 h, eine febrile Erkrankung und bei Frauen keine Durchführung zum Zeitpunkt der Menstruation. Nach Bestimmung des Nüchternblutzuckers trinkt der Erwachsene eine Lösung mit 75g Glukose, wonach eine weitere Blutzuckerbestimmung nach 120 Minuten erfolgt.

### **3.2.3.2 Verlaufsbeurteilung**

Zur Verlaufsbeurteilung und optimalen Stoffwechseleinstellung dienen die regelmässige Blutzuckerbestimmung durch den Arzt sowie die mehrmals tägliche Selbstbestimmung (Renz-Polster H., Krautzig S., Braun J. et al. 2004).

Um einen Einblick in die Lage des Blutzuckers der vergangenen 8 Wochen zu bekommen, dient der HbA1c. Er spiegelt den Anteil an glykosyliertem Hämoglobin am Gesamthämoglobin wieder und steigt linear zum mittleren Blutzucker an.

Bei allen Diabetikern sollte ein individuelles Therapieziel erarbeitet werden. Dabei werden Hypoglykämieeigungen, die Risikoreduktion von Folgekomplikationen, Komorbiditäten und die Therapieadhärenz berücksichtigt. Der angestrebte HbA1c-Wert sollte bei <7,5% liegen, ohne dass schwere Hypoglykämien auftreten (Böhm B.O. et al. 2011).

## **3.2.4 Folgeerkrankungen**

### **3.2.4.1 Mikroangiopathien**

Beim Typ 1 Diabetiker stehen vor allem Folgeerkrankungen im Rahmen der Mikroangiopathien im Vordergrund. Durch die chronische Hyperglykämie kommt es hier zur Gefäßschädigung mit Verdickung der Basalmembran. Diese kommt durch eine Glykosylierung von Proteinen, Änderung der Basalmembranzusammensetzung, Anhäufung von Sorbit in bestimmten Zelltypen mit konsekutiv vermehrter Wassereinlagerung und durch sekundäre Mikrothrombosen zustande (Renz-Polster H., Krautzig S., Braun J. et al. 2004).

### **-Glomerulosklerose (M. Kimmelstil-Wilson)**

Nach 20 Jahren ist bei 20-30% der insulinpflichtigen Diabetiker eine manifeste diabetische Nephropathie mit Proteinurie nachweisbar (Renz-Polster H., Krautzig S., Braun J. et al. 2004).

Durch die Hyperglykämie werden Wachstumsfaktoren in den Nieren wie TGF- $\beta$  und Angiotensin II aktiviert. Dadurch entsteht eine Verdickung der Basalmembran und eine Grössenzunahme der Glomeruli. Die glomeruläre Permeabilität erhöht sich und es lässt sich die zur Früherkennung wichtige Mikroalbuminurie von 30-300mg/24h nachweisen. Durch die Entwicklung einer Glomerulosklerose und interstitiellen Fibrose kommt es schließlich zur Niereninsuffizienz. Eine frühzeitige antihypertensive Therapie, insbesondere mit ACE-Hemmern verzögert die Progression der diabetischen Nephropathie zur terminalen Niereninsuffizienz und reduziert die kardiovaskuläre plus die Gesamtmortalität (Herold et al. 2016). Ausserdem hängt die Häufigkeit und Schwere der Nephropathie von der Stoffwechseleinstellung ab.

### **-Retinopathie**

Nach 15 Jahren entwickeln ca. 90% der Typ 1 Diabetiker eine diabetische Retinopathie. Diabetes ist für 30% aller Erblindungen in Europa verantwortlich (Herold et al. 2016). Pathogenetisch sind hier auch Wachstumsfaktoren von Bedeutung, die zu Gefäßneubildungen anregen sowie zu Mikroangiopathien. Den Verlauf beeinflussen wie bei der diabetischen Nephropathie auch hier die Stoffwechselführung, die Einstellung einer Hypertonie aber auch das Rauchen. Unterscheiden kann man zwischen einer nichtproliferativen Retinopathie, einer proliferativen Retinopathie und der diabetischen Makulopathie. Die nichtproliferative Retinopathie wird je nach Ausmaß der Gefäßveränderungen in verschiedene Schweregrade eingeteilt. Die proliferative Retinopathie ist durch Gefäßneubildungen gekennzeichnet und birgt die Gefahr einer Netzhautablösung und eines sekundären neovaskulären Glaukoms. Die diabetische Makulopathie gefährdet das zentrale Sehvermögen.

### **-Neuropathie**

Nach 10 Jahren Krankheitsdauer haben ca 50% der Diabetiker eine Neuropathie (Herold et al. 2016). Pathogenetisch werden Störungen des Polyol- und Myoinositstoffwechsels, eine Mikroangiopathie der Vasa nervorum mit hypoxischer Schädigung und Störungen des axonalen Transportsystems diskutiert (Renz-Polster H., Krautzig S., Braun J. et al.

2004). Am häufigsten ist hier die periphere sensomotorische Polyneuropathie, welche durch vermindertes Vibrationsempfinden als Frühsymptom auffällig wird. Es zeigen sich distal betonte, symmetrische sensible Reiz- und Ausfallerscheinungen, Areflexie (Achillessehnenreflex), verminderte Thermosensibilität und Schmerzempfindung und später eventuell auch motorische Störungen.

Am zweithäufigsten zeigt sich die autonome diabetische Neuropathie, die das sympathische und parasympathische Nervensystem betrifft. Manifest wird sie kardiovaskulär, im Magen-Darm-Trakt, im Urogenitalsystem, im neuroendokrinen System, an den Pupillen und bei der Thermoregulation.

Seltener sind diabetische Schwerpunktpolyneuropathien, periphere N. facialis-Paresen, Paresen der Augenmuskeln sowie diabetische Radikulopathien.

### **3.2.4.2 Makroangiopathien**

#### **- KHK:**

55% der Diabetiker sterben an einem Herzinfarkt durch eine stenosierende Arteriosklerose der großen Koronararterien. Häufig fehlen klassische pectanginöse Beschwerden aufgrund einer autonomen diabetischen Neuropathie.

#### **- Periphere arterielle Verschlusskrankheit (PAVK)**

Auch hier können Symptome wie Claudicatio intermittens durch eine begleitende Neuropathie fehlen.

#### **- Arterielle Verschlusskrankheit der Hirnarterien und ischämischer Hirninfarkt**

Diabetiker, die gleichzeitig an Hypertonie leiden, haben eine 20-30%ige Wahrscheinlichkeit für ein kardiovaskuläres Ereignis (Herzinfarkt, Schlaganfall) innerhalb der nächsten 10 Jahre. Entwickelt sich zusätzlich eine diabetische Nephropathie, steigt das kardiovaskuläre Risiko auf >30% in 10 Jahren (Herold et al. 2016).

### **3.2.4.3 Das diabetische Fuß-Syndrom**

Das diabetische Fuß-Syndrom ist als Syndrom verschiedener Krankheitsbilder unterschiedlicher Ätiologie definiert, bei dem es durch Verletzungen am Fuß zu einem infizierten Ulkus und zu Komplikationen bis hin zur Extremitätenamputation kommen kann.

### **-Neuropathischer diabetischer Fuß**

Kennzeichnend ist der warme und sehr trockene Fuß. Durch gestörte Sensibilität und reduziertes Schmerz- und Temperaturempfinden entstehen unbemerkte Traumen und als Komplikation schmerzlose neuropathische Ulcera (=Malum perforans) an druckbelasteten Stellen.

**-Diabetisch-neuropathische Osteoarthropathie (DNOAP)** mit Nekrosen im Bereich der Metatarsophalangealgelenke, Tarsometatarsalgelenke (60%) oder anderer Fußgelenke (Charcot-Fuß).

### **-Ischämischer Fuß bei peripherer arterieller Verschlusskrankheit (PAVK)**

Es zeigt sich ein kühler, blasser Fuß mit der Gefahr zur Entwicklung von Nekrosen und feuchter Gangrän der Akren mit drohender Amputation (Herold et al. 2016).

## **3.2.5 Therapie**

Im Mittelpunkt der Therapie des Typ 1 Diabetes steht die exogene Insulinzufuhr. Nahrungs- und Insulinzufuhr müssen optimal aufeinander abgestimmt werden. Eine ausführliche Schulung der Patienten mit Inhalten wie Blutzuckerkontrolle, korrekte Insulindosierung und –injektion, Aufklärung über drohende Entgleisungen und damit verbundenen Risiken, Ernährungsverhalten und Verhalten zur Kontrolle und Minimierung von Folgeerkrankungen ist unverzichtbar.

Eine bestmögliche Lebensqualität soll aufrecht erhalten werden, hypoglykämische Reaktionen sowie schwere Akutkomplikationen sollen vermieden werden.

### **Insulintherapie:**

Der Tagesbedarf eines normalgewichtigen Menschen beträgt 40 IE (Insulineinheit) Insulin. 1 IE senkt den Blutzucker um 30-40 mg/dl, 1 KE (Kohlenhydrateinheit) erhöht den Blutzucker um 30-40 mg/dl, woraus resultiert, dass 1 IE im Durchschnitt 1 KE neutralisiert (Herold et al. 2016). Es gibt zwei Formen der Insulintherapie, die konventionelle Insulintherapie und die intensivierte Insulintherapie.

#### **- Konventionelle Insulintherapie:**

Bei der konventionellen Insulintherapie werden mindestens zweimal täglich Intermediärinsulin oder Insulinmischungen aus Intermediärinsulin und Normalinsulin verabreicht,  $\frac{3}{4}$  vor dem Frühstück und der Rest vor dem Abendessen. Die Art der Insulintherapie ist starr und erfordert eine stabile Stoffwechsellage und ein unflexibles

Essverhalten, damit es nicht zu Stoffwechselentgleisungen kommt. Sie kommt bei Typ 1 Diabetikern nur zum Einsatz, wenn aus verschiedenen Gründen die mehrmalige BZ-Messung sowie eine eigenständige Anpassung der Insulindosierung nicht möglich ist (Renz-Polster H., Krautzig S., Braun J. et al. 2004).

- Intensivierte Insulintherapie:

Prinzip der intensivierten Insulintherapie ist die Aufgliederung in eine Basalrate und in eine mahlzeitenabhängige Insulingabe. Zum einen wird dieses Prinzip durch die intensivierte konventionelle Insulintherapie und zum anderen durch die Insulinpumpentherapie realisiert.

- Intensivierte konventionelle Insulintherapie:

Durch mindestens zweimalige Injektion eines Intermediärinsulins (oder auch einmalig eines Langzeitinsulins) wird der basale Insulinbedarf abgedeckt, welche 40-50% der gesamten Insulintagesdosis abdecken. Die restlichen 50-60% werden auf mahlzeitenabhängige Bolusgaben von Normalinsulin oder noch schneller wirkendes Analoginsulin verteilt. Die Höhe der Bolusgaben richtet sich nach dem KE-Gehalt, dem präprandial gemessenen Blutzuckerwert, der Tageszeit und der geplanten körperlichen Belastung.

- Insulinpumpentherapie:

Zur Insulinzufuhr über eine Insulinpumpe wird ausschließlich Normalinsulin oder schnell wirksames Analoginsulin verwendet. Kontinuierlich wird es subkutan infundiert und so ein konstanter Basalinsulinspiegel aufrecht gehalten. Die Dosierung kann für jede Stunde getrennt programmiert werden, so dass bei tageszeitlichen Schwankungen des Insulinbedarfs, wie beim Dawn-Phänomen, entgegen gewirkt werden kann. Zu jeder Mahlzeit kann sich der Patient die benötigte Bolusinsulingabe über die Pumpe abrufen.

### **Weitere Therapiemöglichkeiten:**

- Pankreastransplantation: Bei Typ 1 Diabetikern mit terminaler Niereninsuffizienz kommt eine kombinierte Pankreas-/Nierentransplantation in Frage. Die 10 J-Überlebensrate ist um 60% höher als bei alleiniger Nierentransplantation (Herold et al. 2016).
- Inselzelltransplantation: Aus dem Spenderpankreas wird durch Behandlung mit Kollagenase und Zellseparator eine Inselzellsuspension aufbereitet und dem Empfänger in die Portalvene injiziert. Anschliessend folgt eine immunsuppressive Therapie des Empfängers (Herold et al. 2016).

- Künstliches Pankreas: In klinischer Erprobung sind Therapieformen wie ein künstliches endokrines Pankreas = Closed-Loop-System. Dieses funktioniert vom Prinzip wie eine Insulinpumpe und ist durch einen Glukosensor und einen Mikrocomputer ergänzt, die eine glukosekontrollierte Insulinzufuhr ohne weitere Blutzuckerbestimmungen möglich machen (Herold et al. 2016).
- Gentherapie: Ein weiterer Therapieansatz liegt in der Gentherapie. Es wird versucht Leberzellen zur Insulinproduktion umzuprogrammieren (Herold et al. 2016).
- Stammzelltherapie
- Immunologische Behandlung: Angriffspunkt ist die autoimmune Zerstörung der Betazellen. Ein Prinzip einiger Studien ist den weiteren Untergang der Betazellen durch Behandlung mit T-Zell-Antikörpern zu verhindern. B. Keymeulen et al. erzielten durch eine Kurzzeitbehandlung von Patienten mit neu diagnostiziertem Diabetes Typ 1 mit CD3-Antikörpern eine Erhaltung der Betazellfunktion über mindestens 18 Monate (Keymeulen et al. 2008).

### **3.2.6 Glukagon und Diabetes mellitus**

Unger und Orci schließen schon früh anhand verschiedener Anhaltspunkte auf eine Bihormonelle Theorie in der Pathogenese des Diabetes mellitus. Sie sehen dabei nicht nur eine Relevanz des relativen oder absoluten Insulinmangels sondern sehen auch die Rolle des Glukagons. Dabei folgt dem Insulinmangel eine verminderte Glukoseverwertung und dem absoluten oder relativen Glukagonüberschuss eine vermehrte Glukosebildung (Unger R.H., Orci L. 1975). Auch Lawecki et al. zeigen tendentiell erhöhte Glukagonwerte nüchtern und nach Argininstimulation bei Typ 1 Diabetikern mit kürzlich zurückliegender Manifestation. Die Insulinspiegel zeigen sich bei ihnen erniedrigt im Gegensatz zu gesunden Kontrollpersonen (Lawecki J. et al. 1976). Bei den Untersuchungen von H. Laube et al. liegen bei Typ 1 Diabetikern dagegen die Glukagonwerte nüchtern und nach Arginin-Stimulation tendentiell niedriger als bei gesunden Kontrollpersonen. Eine Abhängigkeit von der Diabetesdauer bis zu 15 Jahren bestehen nicht. Bei einem Diabetesbeginn vor der Pubertät können in Einzelfällen extrem niedrige Glukagonspiegel gemessen werden (Laube H. et al. 1998). Im Rahmen des Diabetes mellitus Typ 2 sind bereits Therapien zugelassen, die zumindest zum Teil ihre Wirkung durch eine Verminderung der Glukagonsekretion

erbringen. Dies sind die GLP-1 Rezeptor Agonisten und die DPP-IV Inhibitoren (Moon J.S., Won K.Ch. 2015).

## **3.3 Das RAAS**

### **3.3.1 Das systemische Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)**

Das im Blut zirkulierende Renin-Angiotensin-Aldosteron-System spielt als zirkulierendes Hormonsystem eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Flüssigkeitsvolumen, des Blutdrucks und des Elektrolythaushalts (Peach M., 1977).

Das RAAS ist folgendermaßen aufgebaut: In der Leber wird Angiotensinogen gebildet und an das Blut abgegeben. Dort wird es durch die im juxtaglomerulären Apparat der Niere gebildete Protease Renin (Hackenthal E. et al. 1990 aus Leung P.S., Carlsson P.O. 2001) durch Spaltung einer Leucine-Leucine Peptidbindung zu dem Decapeptid Angiotensin I umgewandelt.

Danach kommt das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) zum Einsatz, welches aus dem Angiotensin I das Octapeptid (Leung P.S., Carlsson P.O. 2001) Angiotensin II bildet. Dieses stimuliert, neben weiteren wichtigen Aufgaben in der Nebennierenrinde, die Ausschüttung von Aldosteron, welches in der Niere die Natrium- und Wasserrückresorption, die Kalium- und auch die H<sup>+</sup>-Ausscheidung fördert (Golenhofen et al. 2003).

Eine Reihe an alternativen Peptidasen außer Renin und ACE bilden weitere bioaktive Peptide aus Angiotensin I und II, wie Angiotensin III und IV und Angiotensin (1-7). Dies sind Peptidasen wie Chymase, Chymotrypsin, ACE2 und Aminopetidase A (Leung P.S. et al. 2007). Angiotensin (1-7) wirkt über MAS-Rezeptoren (MAS) (Underwood et al. 2012).

Das systemische RAAS wird durch die Produktion von Renin kontrolliert, das bei niedrigem renalem Perfusionsdruck, reduziertem Elektrolyttransport in den distalen Tubuli oder bei erhöhtem sympathischem Tonus freigesetzt wird (Tikellis C., Cooper M.E. et al. 2006).

Angiotensin II, das eine zentrale Rolle im RAAS spielt, hat neben seiner vasokonstriktorischen Wirkung und seiner Wirkung auf die Aldosteronfreisetzung viele

weitere Funktionen. Es steigert die Katecholaminausschüttung im Nebennierenmark, induziert das Durstgefühl, beeinflusst die Sekretion von Adrenocorticotropin und Vasopressin (Reid et al. 1978 aus Regoli M. et al. 2003). Es erhöht den Sympathikotonus durch zentralen Angriff an der Area postrema und durch die Förderung der präsynaptischen Noradrenalinfreisetzung (Mutschler et al. 1996). Neuer sind die Erkenntnisse über seine Funktionen im Bereich der Zelldifferenzierung und der Regulierung von Wachstum und Hypertrophie. Außerdem wirkt es proinflammatorisch, profibrotisch und prothrombotisch. Diese Einflüsse werden durch direkte Wirkungen in der Niere wie der Stimulierung von profibrotischen Cytokinen und ihren Rezeptoren inklusive Transforming-growth-factor (TGF- $\beta$ 1) und connective-tissue-growth-factor (CTGF) und durch die Aktivierung von angiogenen Cytokinen und verwandten Molekülen vermittelt (Sadoshima J. 2000 aus Tikellis C., Cooper M.E. 2006). Angiotensin II aktiviert über den AT1-Rezeptor die mitogen activated protein kinases (MAPK) und aktiviert den nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (Amaya K. et al. 2004 aus Chipitsyna G. et al. 2007). NF- $\kappa$ B fördert die Expression von proinflammatorischen Genen wie die des monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in den pankreatischen Inseln und Betazellen (Kutlu B. et al. 2003 aus Chipitsyna G. et al. 2007). Die MAPK sind Komponenten von Signalkaskaden, die an Entzündungsvorgängen beteiligt sind und sie bilden proinflammatorische Cytokine (Broom O.J. et al. 2009). Angiotensin II ist ein Prooxidans, diese Wirkung wird teilweise durch die Stimulation der NAD(P)H Oxidase vermittelt (Touyz et al. 2002 aus Tikellis C., Cooper M.E. 2006).

Das von ACE 2 aus Angiotensin II gebildete Angiotensin (1-7) hat dagegen antiangiogene und vasodilatatorische Wirkungen, welche die Wirkungen des Angiotensin II antagonisieren (Ferrario & Chappell, 2004 aus Tikellis C., Cooper M.E. 2006). Angiotensin (1-7) hat außerdem Einfluss auf die Regulierung des renalen Wasser- und Natriumgleichgewichts sowie auf den glomerulären Filtrationsdruck (Ferrario C.M. 1998 aus Tikellis C., Cooper M.E. 2006). Einige Daten weisen darauf hin, dass vasodilatatorische Effekte durch erhöhte Angiotensin (1-7)-Spiegel während der Behandlung mit ACE-Hemmern zu deren antihypertensiven Wirkungen beitragen (Stanziola L. et al. 1999 aus Tikellis C., Cooper M.E. 2006).

Angiotensin II und diese zahlreichen bioaktiven Peptide üben ihre Wirkungen über G-Protein-gekoppelte transmembrane (Ramracheya et al. 2006) Rezeptoren wie Angiotensin-Rezeptor Typ 1 und Typ 2 (ATR1 und ATR2) aus. Weitere Rezeptoren stellen der Typ 3 und Typ 4 dar. Fast alle der bekannten physiologischen Einflüsse von



Angiotensin II werden über den ATR1 vermittelt. Über den ATR1 wird der arterielle Blutdruck, der Elektrolyt- und Wasserhaushalt, das Durstgefühl, die Hormonsekretion und die Nierenfunktion beeinflusst. ATR2 verschwinden in einigen Geweben nach der Geburt und werden manchmal bei Gewebeschäden wieder vermehrt gebildet. Ihre Wirkungen unterscheiden sich stark von denen der ATR1. Sie bewirken antiproliferative Effekte, Zelldifferenzierung, Nervenregeneration und Apoptose (De Gasparo et al. 2000).

Die Rezeptoren spielen eine weitere Rolle im Metabolismus des Angiotensin II, indem es rezeptorgebunden in den Zellen durch lysosomale Enzyme entweder recycelt oder aussortiert wird (Tikellis C., Cooper M.E. 2006).

### **3.3.2 Das lokale RAAS**

Im Laufe der letzten 15 Jahre wurde zusätzlich zu dem systemischen RAAS ein lokales, sich im Gewebe verschiedener Organe gebildetes RAAS entdeckt. Es wurde im Herz-, Niere-, Fett- und Pankreas-, Placenta-, Knochen- und Muskelgewebe gefunden aber auch im Nerven-, Reproduktions-, Verdauungs- und Gefäßsystem (Paul M. et al. 2006 aus Leung P.S. 2007). In menschlichem Gewebe werden Komponenten wie ATR1, ATR2, (Pro)Renin, ACE, Angiotensinogen und der Mineralcorticoidrezeptor gebildet (Luther J.M. et al. 2011). Auch die Bildung von Aldosteron durch Adipozyten wurde festgestellt (Briones A.M. et al. 2012, Goodfriend et al. 1999 aus Underwood et al. 2013).

Es ist zu vermuten, dass die Komponenten wie Angiotensin II intrazellulär gebildet werden und ihre Funktionen auf autokrinem, parakrinem und intrakrinem Weg vermitteln (Carlsson P.O. 2001).

Manche Funktionen ergänzen die des systemischen RAAS und andere unterscheiden sich von diesem. Neben hämodynamischen Wirkungen hat das lokale RAAS Aufgaben im Bereich des Zellwachstums, der -differenzierung, -proliferation und der Apoptose. Es bildet reactive oxygen species (ROS) und ist an Entzündungsvorgängen und der Fibrosierung des Gewebes sowie an der Hormonausschüttung beteiligt (Leung P.S., 2004).

### **3.3.2.1 Das lokale Renin-Angiotensin-System (RAAS) des exokrinen Pankreas**

Im exokrinen Pankreas wird Angiotensin II mit seinen AT1- und AT2-Rezeptoren hauptsächlich an den Epithelzellen der Gangzellen und Blutgefäßen sowie den Azinuszellen dargestellt (Leung P.S. et al. 1997, 1998 aus Leung P.S. 1999). H. Jahr et al. zeigen, dass ACE durch endokrines sowie exokrines Pankreasgewebe exprimiert wird (Jahr H., Fischer B. et al. 2006). Angiotensinogen wird im Zytoplasma der Epithelzellen der humanen Gangzellen lokalisiert (Lam K.Y. et al. 2002). M. Regoli weisen mRNA des Angiotensinogen in den peripher der Inseln gelegenen Alphazellen im Rattenpankreas nach. Sie nehmen an, dass das periinsuläre Azinargewebe durch dieses auf parakrinem Wege beeinflusst wird. Außerdem weisen sie Angiotensinogen im exokrinen Pankreassaft nach. Sie schließen nicht aus, dass dieses zum Teil aus den Azinus- und Gangzellen stammt, jedoch vermuten sie, dass dieses seinen Ursprung in den Inseln hat (Regoli M. et al. 2003).

Das lokale RAAS im Pankreas ist an der Regulierung der Mikrozirkulation, der azinären Enzymsekretion und an der dukталen Anionensekretion beteiligt (Carlsson P.O. et al. 1998, Tsang S.W. et al. 2004, Fink A.S. et al. 2002 aus Leung P.S. 2007).

Leung et al. zeigen, dass die Expression der Komponenten des lokalen RAAS, besonders des ATR1 und ACE, unter experimentellen Bedingungen während einer Pankreatitis hochreguliert ist (Leung P.S. et al. 1999; Ip S.P., Leung P.S. et al. 2003 aus Leung P.S. 2007). Prophylaktische Gabe von Saralasin, einem unspezifischen AT1/AT2-Antagonist, reduziert die Schwere einer akuten Pankreatitis (Tsang S.W., Ip S.P., Leung P.S. et al. 2003 aus Leung P.S. 2007). Die Aktivität des pankreatischen RAAS könnte mit erhöhtem oxidativen Stress verbunden sein, welcher zu einer Pankreasentzündung und –verletzung führt (Ip S.P., Tsang S.W., Leung P.S. et al. 2003 aus Leung P.S. 2007). Die Aktivität des pankreatischen RAAS während einer Pankreatitis wird sogar mit einer ATR1-vermittelten NADPH-Oxidase-Aktivität, welche eine pankreatische Entzündung verursacht, in Verbindung gebracht (Tsang S.W., Ip S.W., Leung P.S. 2004 aus Leung P.S. 2007).

### **3.3.2.2 Das lokale RAAS des endokrinen Pankreas**

Verschiedene Studien demonstrieren die Existenz verschiedener Komponenten eines lokalen RAAS in isolierten Pankreasinseln.

R.D. Ramracheya et al. können die Expressierung der ATR1-mRNA durch menschliche Betazellen demonstrieren. Sie stellen außerdem fest, dass humane Alpha- und Deltazellen sowie auch nicht-endokrine Zellen der Inseln den ATR1 exprimieren (Ramracheya R.D. et al. 2006). H. Jahr et al. können durch Färbungen von menschlichen Inselzell-Suspensionen eine vorwiegende Lokalisation von ATR1 auf den glukagonproduzierenden Alphazellen nachweisen (Jahr H., Fischer B. et al. 2006). M. Tahmasebi et al. zeigen ATR1 auf menschlichen Betazellen und Endothelzellen (Tahmasebi M. et al. 1999). Interessant ist auch die Entdeckung, dass der ATR1 nicht nur auf der Zellmembran von Betazellen vorhanden ist, sondern auch intrazellulär. Dies macht die intrakrine Funktion von Angiotensin II deutlich (Leung P.S., Carlsson P.O. 2005).

Die Expressierung von ATR2 wird in Somatostatin-produzierenden Deltazellen demonstriert (Tikellis C., Cooper M.E. et al. 2006).

(Pro)Renin wird in Betazellen und Endothelzellen nachgewiesen, während (Pro)Renin-mRNA nur im Bindegewebe um die Blutgefäße und in den retikulären Fasern in den Inseln gefunden wird (Tahmasebi M. et al. 1999; Leung P.S. et al. 1999 aus Flemming I. et al. 2006).

Regoli et al. können anhand ihrer Untersuchungen mRNA von Angiotensinogen in den peripher der Inseln gelegenen Alphazellen nachweisen. Dies weist stark auf eine Expressierung des Angiotensinogens durch diese Zellen hin. Allerdings wird Angiotensinogen nicht in der Nähe der Glukagon-enthaltenden Granula nachgewiesen, wodurch Regoli et al. zwei unterschiedliche Sekretionswege von Glukagon und Angiotensinogen vermuten (Regoli et al. 2003).

ACE wird im endokrinen Pankreasgewebe von Ratte, Maus und Mensch exprimiert (Jahr H., Fischer B. et al. 2006).

Angiotensin-Peptid wurde erstmals 1991 im Kaninchenpankreas nachgewiesen. Der Spiegel war höher als der des zirkulierenden Angiotensin, was auf die Aktivität eines Angiotensin produzierenden lokalen Systems hinweist (Chappell M.C. et al. 1991 aus Tikellis C., Cooper M.E. et al. 2006).

Die lokale Produktion von Angiotensin II in den pankreatischen Inseln wird von Lau et al. demonstriert (Lau et al. 2004 aus Tikellis C., Cooper M.E. et al. 2006).

Von J.M. Luther wird die Bildung des Mineralcorticoid-Rezeptors (MR) in pankreatischen Inseln von Mäusen und Menschen beschrieben. Diese lokalisieren sich hauptsächlich in  $\delta$ - und PP-Zellen (Luther J.M. et al. 2011).

### **3.3.2.3 Das lokale RAAS in Zusammenhang mit dem Diabetes mellitus Typ 2**

Bei Patienten mit Hypertonie und chronischer Herzinsuffizienz wird durch die Behandlung mit ACE-Hemmern und Angiotensin II-Rezeptorblockern der Entwicklung eines Typ 2 Diabetes vorgebeugt (Scheen A.J. et al. 2004 aus Leung P.S. et al. 2007). Eine große Metaanalyse zeigt, dass das durchschnittliche Risiko zur Entwicklung eines Typ 2 Diabetes unter ACE-Hemmern um 27%, unter AT1R-Rezeptorblockern um 23% und insgesamt um 25% bei ihnen gesenkt werden kann (Abuissa H. et al. 2005 aus Leung P.S. et al. 2007).

Zwei große Studien wurden initiiert um die Effekte von AT1R-Blockern und ACE-Hemmern zur Prävention und Reduktion der Manifestation eines Diabetes mellitus Typ 2 zu erheben. Das ist der „Diabetes Reduction Assessment with Ramipril and Rosiglitazone Medication“ (DREAM) trial und der “Nateglinide And Valsartan in Impaired Glucose Tolerance Outcomes Research” (NAVIGATOR). Die DREAM Studie zeigt bisher bei Patienten mit erhöhten Nüchtern glukosewerten ohne kardiovaskuläre Risiken keine Reduktion der Inzidenz eines Diabetes bei Patienten mit erhöhter Nüchtern glukose nach der Behandlung mit Ramipril (DREAM et al. 2006 aus Luther J.M. et al. 2011). Allerdings kann bei ihnen ein vermehrter Rückgang des Blutzuckers zur Normoglykämie beobachtet werden und der Median des 2 h OGGT Glukosewertes war in der Ramiprilgruppe niedriger (Luther J.M. et al. 2011). Die NAVIGATOR-Studie vergleicht bei Patienten mit gestörter Glukosetoleranz und mit kardiovaskulären Risiken und Erkrankungen den Effekt von Valsartan und einem Placebo auf die Entwicklung eines Diabetes. Die Inzidenz eines Diabetes ist moderat, aber signifikant niedriger in der durch Valsartan behandelten Gruppe (McMurray et al. 2010 aus Luther J.M. et al. 2011).

K.Y. Chu et al. können der Entwicklung eines Diabetes durch Losartan-Verabreichung bei db/db – Mäusen nicht vorbeugen. Db/db Mäuse sind adipositas-induzierte Tiermodelle des Diabetes Typ 2. Lediglich die Entstehung einer Hyperglykämie kann verzögert werden und eine bestehende Hyperglykämie und Glukoseintoleranz abgeschwächt werden. Die Diskrepanz zu anderen Studien kann durch die hohe Disposition der db/db-Mäuse zur Entwicklung eines Diabetes erklärt werden (Chu K.Y., Leung P.S. 2006).

Eine Metaanalyse zeigt auf, dass das relative Risiko zur Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 durch ACE-Hemmer und Angiotensin II Rezeptor Blocker im Vergleich zur Diuretikatherapie um 33% bzw. 38% vermindert ist (Elliot W.J. et al. 2007 aus Bozkurt Ö. et al. 2009).

R. Lupi et al. demonstrieren, dass die Exprimierung der mRNA von RAAS-Komponenten wie Angiotensinogen, ACE und ATR1 in isolierten menschlichen Pankreasinseln durch Zugabe von 22,2 mmol/l Glukose erhöht ist. Dieser Effekt kann durch die ACE-Hemmer Zofenoprilat oder Enalaprilat im Kulturmedium normalisiert oder reduziert werden (Lupi R. et al. 2006). C. Tikellis et al. demonstrieren in ihren Versuchen anhand eines Rattenmodels, den „Zucker diabetic fatty“ Ratten, immunhistochemisch und anhand von real-time PCR die Hochregulierung der RAAS-Komponenten, darunter ATR1 und ACE, unter Bedingungen eines Typ 2 Diabetes (Tikellis C. et al. 2004).

Auch andere Faktoren wie Hyperlipidämie, Übergewicht (Barton M. et al. 2003), Entzündung (Kuno A. et al. 2003) und auch die Hypertonie sind womöglich an der Aktivierung des lokalen RAAS beteiligt (aus Jandeleit-Dahm K. et al. 2005).

Es wird diskutiert, ob die metabolischen Effekte der ACE-Hemmer lediglich dem verbesserten kardiovaskulären Zustand zuzuschreiben sind. Die UKPDS-Studie zeigt jedoch, dass Patienten, die mit Captopril behandelt werden, niedrigere HbA1c-Spiegel haben und weniger Antidiabetika benötigten als Patienten, die mit dem Betablocker Atenolol behandelt werden (UK Prospektive Diabetes Study Group, 1998 aus Jandeleit-Dahm K. et al. 2005).

Eine Studie von J.Q. Shao et al. zeigt eine blutdruck- und dosisunabhängige Verbesserung der Glukosetoleranz und Betazellfunktion durch die Behandlung von db/db-Mäusen mit Candesartan über 6 Wochen. Diese Verbesserungen erklären sie sich durch eine Minderung des oxidativen Stresses und einer Inselfibrose, durch Verbesserung der Blutzufuhr und durch die Abschwächung der Zerstörung der Ultrastruktur (Shao J.Q. et al. 2007).

Insgesamt zeigen die großen Studien Unterschiede bezüglich des Zusammenhangs des RAAS und der Entwicklung eines Diabetes. Dies hängt wahrscheinlich mit dem Typ der Population, der aktuellen Medikation, Dauer und Dosierung der verabreichten Medikamente und mit einer interindividuellen Variabilität bezüglich der Zusammenhänge des RAAS und der Insulinresistenz zusammen (Underwood et al. 2012).

Wie das lokale RAAS seinen Einfluss nehmen könnte bleibt noch unklar, jedoch gibt es verschiedene Hinweise, die auf einen möglichen Mechanismus deuten könnten. Ansatzpunkte sind die in der Entwicklung eines Typ 2 Diabetes wichtigen pathophysiologischen Vorgänge, die zur Insulinresistenz, aber auch die, die zu einer Betazell dysfunktion führen.

Einfluss des lokalen RAAS auf die Insulinresistenz:

M.C. Munoz et al. untersuchen den Zusammenhang zwischen Angiotensin II und der Pathogenese der Hypertonie sowie der Insulinresistenz an „obese Zucker rats“. Diese stellen ein Model für das metabolische Syndrom dar. Bei ihnen lässt sich eine Hyperglykämie, Hypertriglyceridämie, Hyperinsulinämie, Hypercholesterinämie und ein erhöhter systolischer Blutdruck nachweisen. Außerdem ist die Aktivität der Insulinsignalwege über den Insulinrezeptor/Insulinrezeptor Substrat1/Phosphatidylinositol 3 kinase/Akt - Signalweg im Fettgewebe erhöht. Die Adipozyten sind vergrößert und die Makrophageninfiltration sowie das Vorkommen von Angiotensin II und Entzündungsmediatoren wie TNF- $\alpha$  und MCP-1 ist erhöht. Eine längerfristige Behandlung mit Irbesartan kann bei ihnen alle abnormen Veränderungen verbessern. Als mögliche Mechanismen vermuten M.C. Munoz et al. einen Einfluss des Angiotensin II über die Insulinsignalwege (Munoz M.C. et al. 2009).

Ein anderer Ansatzpunkt stellt der Einfluss des lokalen RAAS auf die Durchblutung dar. Durch Reduktion des Gefäßwiderstandes kann eine ACE-Blockade die metabolische Kontrolle durch eine vermehrte Durchblutung des Skelettmuskels und/oder der Pankreasinseln durch Reduktion des Gefäßwiderstandes verbessern (Henriksen E.J. et al., Tikellis C. et al. aus Jandeleit-Dahm K. et al. 2005).

Spekuliert wird, ob der ACE-Hemmer Enalapril die Insulinsensitivität über den Vasodilatator Bradykinin verbessert (Tomiya H. et al. 1994). Der durch die Inhibierung des RAAS verursachte Anstieg von Bradykinin könnte durch Zunahme der Stickstoffmonoxid-Produktion die Sensitivität der Muskeln für Insulin erhöhen (Balon T.W. et al. 1997; Henriksen E.J. et al. 1999) (aus Leung P.S. 2007). Eine Studie, die durch AT1R-Blocker, also einer Blockade ohne Einfluss auf die Bradykinine, eine verminderte Insulinresistenz bei Patienten mit essentieller Hypertonie nachweist (Higashiura K. et al. 1999), macht einen Einfluss über Bradykinin unwahrscheinlich (aus Jandeleit-Dahm K. et al. 2005).

Ein weiterer Ansatzpunkt zur Vorbeugung eines Typ 2 Diabetes durch eine RAAS-Blockade ist ein Insulinresistenz fördernder Einfluss des lokalen RAAS auf die Adipozyten (Engeli S. et al. 2003). Es wird angenommen, dass lokal gebildetes Angiotensin II antifettbildende Wirkungen über den AT1R vermittelt. Dadurch wird die Differenzierung der Präadipozyten gehemmt und die spätere Neusynthese von insulinsensitiven Adipozyten verzögert, was zur Verstärkung der Insulinresistenz führt (Janke J. et al. 2002). Umgekehrt gedacht könnte hier eine RAAS-Blockade die Differenzierung in reife Adipozyten fördern und die Insulinsensitivität verstärken (Sharma A.M. et al. 2002 aus Leung P.S. 2007).

Neben den oben beschriebenen negativen Einflüssen des lokalen RAAS auf die Insulinsensitivität gibt es dazu auch widersprüchliche Ergebnisse. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Einflüssen wird gezeigt, dass Losartan als AT1-Rezeptor-Blocker den Insulinsensitivität steigernden (und nicht senkenden) Effekt des Angiotensin II in vitro und in vivo aufheben soll (Juan C.C. et al. 2005 aus Leung P.S. 2007). K.Y. Chu können keine Auswirkung von Losartan auf die Insulinsensitivität am Tiermodell nachweisen (Chu K.Y. et al. 2006).

Teilweise ist es unklar, ob die positiven Effekte einer RAAS-Blockade durch einen Einfluss des zirkulierenden RAAS oder des lokalen RAAS zu erklären sind. Z. Zhan et al. zeigen eine vermehrte Bildung von AT1R bei db/db-Mäusen als bei nichtdiabetischen db/m-Mäusen, was auf eine vermehrte Bildung in diabetischen Pankreasinseln hinweist. Sie inhibieren gezielt durch eine RNA-Interferenztechnik die Bildung des AT1R der Inselzellen. Dadurch können sie eine vermehrte Glukose-stimulierte Freisetzung von Insulin und eine verminderte Glukagonfreisetzung beobachten (Zhang et al. 2013). Eine Studie zeige, dass Enalapril den Glukagonspiegel bei insulinresistenten Mäusen reduzieren kann (Frantz E.D.C. et al. 2013).

Ein weiterer möglicher Mechanismus, wie das lokale RAAS seinen Einfluss auf den Glukosemetabolismus nimmt, wird in Zusammenhang mit Angiotensin (1-7) und der Kaskade über ACE2/Ang 1-7/MAS gebracht (Underwood et al. 2012). Insgesamt scheint es einen Einfluss über diesen Weg auf die Insulinbiosynthese, die Durchblutung der Inseln und die Insulinsekretion der Betazellen zu geben. Das RAAS kann als ein dual funktionierendes System angesehen werden mit einem Gleichgewicht zwischen der ACE- und ACE2-Achse mit ihren entsprechenden Mediatoren (Wang L., Leung P.S. 2013).

Weiter werden verschiedene Einflüsse über den Mineralcorticoid Rezeptor durch Aldosteron oder Cortisol auf die Insulinresistenz unabhängig von Ang II beschrieben (Underwood et al. 2012).

Einfluss des lokalen RAAS auf die Betazellfunktion:

Der Verlust der Betazellfunktion spielt beim Typ 1 und beim Typ 2 Diabetes eine pathogenetische Rolle. Es gibt Untersuchungen, die speziell auf den Typ 2 Diabetes abzielen:

Eine Verabreichung von Losartan über 8 Wochen, einem spezifischen AT1R-Antagonist, verstärkt bei db/db-Mäusen die Glukose-induzierte Insulinsekretion und die (Pro)Insulin-Biosynthese. Eine durch Fettleibigkeit induzierte Hyperglykämie wird dadurch dosisabhängig vermindert und eine Glukoseintoleranz kann bei ihnen mit 10mg/kg/Tag Losartan reduziert werden (Chu K.Y., Lau T. et al. 2006). K.Y. Chu und P.S. Leung zeigen an jungen db/db-Mäusen, dass eine Aktivierung von AT1-Rezeptoren zu einer fortschreitenden Betazelldysfunktion durch eine durch uncoupling protein 2 (UCP2)-vermittelte oxidative Schädigung führen kann. Losartan kann bei ihnen die UCP2-Expression durch eine Abnahme der NADPH-Oxidase unterdrücken und dadurch die Sekretionsleistung der Betazellen verbessern sowie einen durch Apoptose verursachten Betazellverlust vermindern (Chu K.Y., Leung et al. 2006).

Chu et al. zeigen, dass AT1-Rezeptoren keinen Effekt auf die normale Inselfunktion haben, aber unter bestimmten Bedingungen bei Typ 2 Diabetes-Mäusen (db/db-Mäusen) hochreguliert sind. Dabei wirken sie sich negativ auf die Insulinfreisetzung und -Biosynthese aus (Chu K.Y. et al. 2006). Leung et al. zeigen eine dosisabhängige Hochregulierung der AT1R-Expression einer INS-1E-Betazelllinie unter hyperglykämischen Bedingungen. Sie vermuten außerdem eine darüber vermittelte Zunahme an NADPH-abhängigem oxidativem Stress, der dann die sekretorische Funktion der Betazellen einschränkt (Leung K.K. et al. 2008).

R. Lupi et al. zeigen eine Verminderung der Insulinsekretion unter Hyperglykämie, die mit vermehrtem oxidativem Stress assoziiert ist. Der oxidative Stress ist gekennzeichnet durch erhöhte Konzentrationen von Nitrotyrosinen und vermehrter Expression der Protein Kinase C  $\beta$  (PKC $\beta$ ) und der NADPH-Oxidase. Die ACE-Hemmer Enalaprilat und Zofenprilat können hier entgegen wirken und die Insulinsekretion verbessern. Zofenprilat zeigt gegenüber Enalaprilat die größeren Effekte. Zofenprilat unterscheidet



sich von Enalaprilat durch das Vorhandensein einer Sulphydryl-Gruppe und hat dadurch womöglich die größere antioxidative Wirkung (Lupi R. et al. 2006).

R.D. Ramracheya et al. demonstrieren die Expressierung von ATR1 auf Betazellen und eine direkte Stimulierung der Betazellen von Menschen und Mäusen zur Insulinsekretion durch Angiotensin II. Sie sehen es als höchstwahrscheinlich an, dass durch Angiotensin II vermittelte Anstiege des intrazellulären Calcium die Insulinsekretion fördern (Ramracheya R.D. et al. 2006).

C. Tikellis führen Untersuchungen an ZDF-Ratten (Zucker diabetic fatty) durch. Diese werden über 10 Wochen mit dem ACE-Hemmer Perindopril, dem AT1R-Blocker Irbesartan oder keinem der beiden behandelt. Durch beide Medikamente wird die Fibrose in den Inseln, die Apoptose und der oxidative Stress vermindert. Die hohe Genexpressierung des Transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) bei den ZDF-Ratten wird reduziert. Außerdem verbessert sich die erste Phase der Insulinsekretion (Tikellis C. et al. 2004).

Leung et al. zeigen durch ihre Studien, dass endogene Angiotensin II-Spiegel in transplantierten Mäuseinseln über den ATR1 beeinträchtigende Wirkungen auf deren Durchblutung haben. In dieser Studie senken akute Angiotensin II-Gaben die Durchblutung des Inseltransplantats, die Sauerstoffversorgung und die Glukose-stimulierte Insulinsekretion (Leung P.S. et al. 2007).

In einem Artikel von 2007 erläutern P.S. Leung et al. einen umfassenden pathophysiologischen Weg zur Betazelldysfunktion: Sie nehmen aus den Ergebnissen verschiedener Studien an, dass durch chronische Hyperglykämie und Hyperlipidämie das lokale RAAS aktiviert wird. Die Inseldurchblutung und die (Pro)Insulin-Biosynthese wird vermindert, der oxidative Stress sowie die proinflammatorischen Cytokine vermehrt. Daraus resultiert die Apoptose und Fibrose der Inseln mit Abnahme der Betazellmasse und der Insulinsekretion (Leung P.S. et al. 2007).

Bei Diabetikern findet sich diese Fibrose v.a. im „islet exocrine interface“, d.h. an der Schnittstelle zwischen endokrinem und exokrinen Pankreas. Dieses „islet exocrine interface“ ist eine wichtige anatomische und funktionelle Struktur, die den neurovaskulären Bestand mit afferenten und efferenten Gefäßen enthält und eine Kommunikation zwischen endo- und exokrinen Pankreas erlaubt. Hier finden sich Ablagerungen von frühem fibrillärem Kollagen sowie ein zelluläres Remodelling der Perizyten. Innerhalb der Langerhans'schen Inseln und den Betazellen ließen sich

dagegen keine Unterschiede zu gesunden Kontrollen im Sinne von Apoptose oder Fibrose nachweisen (Hayden M.R., Sowers J.R. 2007).

In vitro führt eine hochdosierte Glukosebehandlung zu einer Hochregulation verschiedener RAS-Komponenten (Angiotensinogen, AT1-Rezeptoren und ACE), TGF- $\beta$ 1 und dadurch zu einem vierfachen Anstieg der extrazellulären Matrix-Synthese durch Pankreassternzellen und damit zu einer Fibrose (Ko S.H., Hong O.K. et al. 2006). Auch Reinehr et al. weisen nach, dass Angiotensin II durch Glukoseerhöhung stimuliert wird und die Proliferation der Pankreassternzellen induziert (Reinehr R., Zoller S. et al. 2004; Ko S.H., Hong O.K. et al. 2006).

### **3.3.2.4 Das lokale RAAS in Zusammenhang mit dem Diabetes mellitus Typ 1**

Bekannt ist, dass Angiotensin II verschiedene immunmodulatorische Funktionen hat. Wie oben bereits beschrieben ist beim Typ 1 Diabetes die autoimmune Insulitis pathogenetisch von großer Bedeutung. Über den Typ 1 Diabetes gibt es im Vergleich zum Typ 2 wenig Literatur im Zusammenhang mit dem lokalen RAAS, jedoch gibt es auch hier einige Veröffentlichungen über mögliche Einflüsse und Mechanismen:

Studien zeigen, dass Angiotensin II durch den AT1-Rezeptor und extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2)-abhängige Mechanismen die Produktion des monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) stimuliert und dadurch eine inflammatorische Reaktion in den Inseln und Betazellen auslöst. MCP-1 ist ein Chemokin und spielt damit eine wichtige Rolle in der Rekrutierung von mononuklearen Zellen. Schon ab dem Alter von 2 Wochen wird in den Pankreata von non-obese-diabetic (NOD) Mäusen ACE-mRNA und -Protein nachgewiesen. Die Entwicklung einer Insulitis und die Progression zur Hyperglykämie sowie die Betazellzerstörung korrelieren mit erhöhten ACE-Werten, was zeigt, dass die Bildung von Angiotensin II ein aktiv fortschreitender Prozess in der Entwicklung des Diabetes mellitus ist. Es kann auch gezeigt werden, dass ACE in den meisten Inselzellen durchgehend exprimiert ist und mit MCP-1 kolokalisiert, was eine endogene autokrine/parakrine Interaktion vermuten lässt (Chipitsyna G. et al. 2007).

Ch. Gray et al. erzielen ähnliche Ergebnisse bei der Untersuchung von NOD-Mäusen. Auch sie demonstrieren, dass die Exprimierung eines Angiotensin II bildenden Systems mit einer Entzündung der Inseln und der Progression einer Hyperglykämie korreliert.

AT1R-mRNA und Proteinspiegel steigen mit zunehmender destruktiver Insulitis und Progression des Diabetes. Diese werden immunhistochemisch in den Inselzellen und einigen Duktuszellen lokalisiert. Auch sie beschreiben die Induzierung des MCP-1 über einen AT1R-abhängigen Mechanismus. Durch ihre Studien vermuten sie einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung des lokalen AT1R und dem Fortschreiten einer destruktiven Insulitis und damit der Schwere eines Diabetes. Eine medikamentöse Blockierung des AT1R und damit den Eingriff in die über AT1R vermittelte Induktion von proinflammatorischen Molekülen sehen sie als möglichen Ansatzpunkt für eine neue therapeutische Strategie bei Diabetes mellitus Typ 1 (Gray Ch. et al. 2007).

Betazellen sind anfällig gegenüber oxidativem Stress. Wie oben beschrieben kann Angiotensin II den oxidativen Stress unter anderem durch die Aktivierung der NADPH-Oxidase steigern (Tikellis C., Cooper M.E. et al. 2006).

Ein völlig anderer Berührungspunkt mit dem lokalen RAAS und dem Typ 1 Diabetes wird von Wong et al. demonstriert. Es wird die Beteiligung der ACE2-Achse an der Regulierung des Glukosetransports in Enterozyten des Jejunums von Ratten mit Typ 1 Diabetes gezeigt (Wong T.P. et al. 2012).

## **3.4 Bedeutung des Angiotensin-Converting Enzyms und des I/D Polymorphismus**

### **3.4.1 Struktur und Funktionen des Angiotensin-Converting Enzyms**

Wie oben beschrieben ist ACE eine wichtige Schlüsselkomponente im RAAS. Es hydrolysiert Peptide wie das Angiotensin I zur Bildung von Angiotensin II (Coates D. 2003). Damit spielt es eine entscheidende Rolle in der Regulierung des Wasser- und Elektrolythaushaltes, des Blutdrucks und bei vielen anderen Funktionen, die oben im Zusammenhang mit dem RAAS beschrieben wurden.

ACE spielt außerdem eine Rolle in einem weiteren Hormonsystem, nämlich der Bradykinin-Kallikrein Kaskade. Hier metabolisiert es das vasodilatatorische Bradykinin, indem es die inaktiven Formen Bradykinin 1-5 bildet. Auch hierdurch hat es somit wieder Einfluss auf die Blutdruckregulation (Sayed-Tabatabaci F.A. et al. 2005).

Das ACE ist eine membrangebundene  $Zn^{2+}$ -abhängige Metallopeptidase (Chipitsyna G. et al. 2007). Es sind zwei Isoformen bei Säugetieren bekannt, eine in somatischem Gewebe (sACE) und eine in den Keimzellen der Hoden (gACE). Das sACE besitzt eine N- sowie eine C-Domain, gACE hat dagegen nur eine aktive Stelle, die der C-Domain des sACE entspricht (Coates D. 2003).

Immunohistochemische Färbungen (Danilov et al. 1994 aus Coates D. 2003) zeigen, dass sACE in vielen Endothelzellen, vor allem in Arteriolen, kleinen muskulären Arterien und in normalen Kapillaren der Lunge gebildet wird. Deutlich kann es in den Epithelzellen der Niere, des Dünndarms und den Nebenhoden und in einer Auswahl an Nervenzellen im Gehirn nachgewiesen werden. Mittels „expressed sequence tags“ (EST) kann eine quantitative Bestimmung der Expression bestimmt werden. Sie ist im Thymus, Gehirn, Skelettmuskel, Prostata und in der Niere hoch. sACE-mRNA kann in praktisch allen Geweben nachgewiesen werden. Die zweite Isoform, das gACE, ist dagegen auf männliche Keimzellen beschränkt (Coates D. 2003).

ACE2 ist ein weiteres menschliches ACE, das seine Funktion als Regulator der Herzfunktion hat (Crackower et al. 2002 aus Coates D. 2003) und eine Rolle in der kardiovaskulären Pathologie spielt. Es kann nicht durch die gewöhnlichen spezifischen ACE-Hemmer gehemmt werden und hat ein anderes Spektrum an Substraten als ACE. Zwar ist Angiotensin II ebenfalls ein Substrat des ACE2, aber Bradykinin wiederum nicht (Turner A.J., Hooper N.M. 2002 aus Coates D. 2003). ACE2 ist eine Carboxypeptidase, die aus Angiotensin I das Nonapeptid Angiotensin (1-9) und aus Angiotensin II das Angiotensin (1-7) bildet (Tikellis C., Cooper M.E. et al. 2006).

ACE2 wird im Herz, in der Niere und in den Hoden lokalisiert und ist im Körper damit längst nicht so weit verbreitet wie das ACE (Donoghue M. et al. 2000; Tipnis S.R. et al. 2000 aus Sayed-Tabatabaci F.A. et al. 2005).

### **3.4.2 Die Bedeutung des I/D Polymorphismus**

Das menschliche ACE wird auf dem langen Arm des Chromosoms 17 (17q23) kodiert, umfasst 21 Kilobasen und enthält 26 Exons (Coates D. 2003).

Der Insertions/Deletions Polymorphismus zeigt das Vorhandensein (Insertion, I) oder das Fehlen (Deletion, D) einer 250-Basenpaare(bp)-Sequenz des ACE-Gens (Rigat B. et al. 1990).

Misst man den ACE-Wert im Blut bei einem Individuum, ist er relativ stabil. Unterscheidet man die Werte zwischen verschiedenen Individuen, kann man große Unterschiede feststellen (Alhenc-Gelas F. et al. 1991 aus F. A. Sayed-Tabatabaci et al. 2005). B. Rigat et al. zeigen, dass ungefähr die Hälfte der phänotypischen Variabilität der Plasmawerte zwischen verschiedenen Individuen dem I/D-Polymorphismus zugeschrieben werden können. Sie fanden heraus, dass die ACE-Werte bei DD-Polymorphismustypen annähernd doppelt so hoch sind wie bei II-Typen. Beim ID-Typ können Werte zwischen denen der DD- und II-Typen festgestellt werden, was eine Kodominanz aufweist (Rigat B. et al. 1990). Es wird auch gezeigt, dass der ID-Polymorphismus nicht nur die ACE-Werte im Plasma, sondern auch die im Gewebe beeinflusst (Costerousse O. et al. 1993; Danser A.H. et al. 1995 aus Sayed-Tabatabaci F.A. et al. 2005). Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass es sich bei diesem Polymorphismus um einen funktionellen handelt, d.h., dass er Genfunktionen beeinflusst. Die Tatsache, dass er auf einer nicht-kodierenden Region liegt, lässt daran wiederum zweifeln. Zahlreiche Studien wurden durchgeführt, um die Beschaffenheit und die Lokalisation des funktionellen Polymorphismus, der für die ACE-Werte im Blut verantwortlich ist, zu erforschen. Auch wenn es hier bisher zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis kam, stimmen die Studien in der kaukasischen Bevölkerung mindestens in einer Tatsache überein. Der Großteil der Polymorphismen in der vermuteten Region des Gens ist eng mit dem I/D-Polymorphismus verbunden. So wurde dieser als ein gültiger Marker für Zusammenhänge und pathophysiologische Vorgänge im Zusammenhang mit dem eigentlich unbekannten funktionellen Polymorphismus verwendet (Sayed-Tabatabaci F.A. et al. 2005).

Betrachtet man die Verteilung der verschiedenen Polymorphismen in der Bevölkerung, können Unterschiede in verschiedenen ethnischen Gruppen festgestellt werden. Zu dem Schluss kamen auch A. Halim Salem und M. A. Batzer durch ihre Untersuchungen in der arabischen Bevölkerung unter der Beobachtung unterschiedlicher ethnischer Hintergründe (Halim Salem A., Batzer M.A. 2009).

Viele Studien wurden durchgeführt, um den Einfluss des I/D-Polymorphismus auf verschiedene Krankheiten zu untersuchen. Dabei wurden die Inzidenz, Symptome und Manifestationen von Krankheiten sowie ihre Heilungsraten, der Krankheitsverlauf und die Überlebenswahrscheinlichkeit untersucht. Außerdem auch die Effizienz von Medikamenten und Therapien und die Interaktionen mit anderen genetischen Einflüssen und Umweltfaktoren (Sayed-Tabatabaci F.A. et al. 2005).

Zur Untersuchung des Einflusses des I/D-Polymorphismus auf den Diabetes mellitus Typ 2 wurden einige Studien in verschiedenen Populationen durchgeführt. Yan Feng et al. untersuchten 2002 den Einfluss in einer chinesischen Population. Ihre Studie ergab eine höhere Anfälligkeit des DD-Typ zur Entwicklung eines Typ 2 Diabetes (Feng Y. et al. 2002). Eine weitere große Metaanalyse wurde von W. Niu et al. veröffentlicht. Sie kommen zu dem übereinstimmenden Ergebnis, dass das D-Allel mit einem erhöhten Risiko für einen Typ 2 Diabetes assoziiert ist. Eine Analyse der Subgruppen ergab ein deutlicheres Ergebnis bei Populationen aus Afrika und Europa. Sie sehen einen Unterschied zu anderen Studienergebnissen durch verschiedene Methoden der Studien, der Größe des Kollektivs sowie durch einen Unterschied zwischen den Populationen (Niu et al. 2010).

P. Moleda et al. untersuchten 2005 den Zusammenhang des I/D-Polymorphismus mit der Insulinresistenz, welche sie mit dem HOMA-Index quantifizierten. Sie konnten keine Assoziation feststellen (Moleda P. et al. 2005).

Weitere Studien untersuchen den Zusammenhang des ACE-Gen und der diabetischen Nephropathie. So beschreiben Andrew P. Boright et al. 2005 in der Kohorte der DCCT/EDIC, dass der II-Typ ein geringeres Risiko für Mikroalbuminurie und eine schwerwiegende Nephropathie aufweist als der ID-Typ (Boright A.P. et al. 2005 aus Sayed-Tabatabaci F.A. et al. 2005). B. Kennon et al. durchsuchten MEDLINE, PubMed und EMBASE nach Schlüsselwörtern wie „Diabetes mellitus“, „Diabetische Nephropathie“, „ACE Polymorphismus“ und „Genotyp“ und überarbeiteten die gefundene Literatur systematisch. Der ACE-Polymorphismus scheint auch nach ihren Untersuchungen eine signifikante Bedeutung bei der Progression der diabetischen Nephropathie zu spielen. Die Identifikation der Menschen, die resistent gegenüber der Effekte einer ACE-Blockade sind, könnte somit therapeutische Konsequenzen haben (Kennon B. et al. 1999). Eine weitere Studie zeigt, dass eine medikamentöse RAAS-Blockade besonders bei II- und ID-Typen mit reduziertem Mortalitätsrisiko und einem geringeren Risiko zum Erreichen von renalen Endpunkten, bei chinesischen Typ 2 Diabetikern einhergeht (So W.Y. et al. 2006).

### **3.4.3 Die medikamentöse Blockade des RAAS durch ACE-Hemmer und ATII-Blocker**

Es gibt verschiedene Inhibitoren, die Einfluss auf das RAAS nehmen. Dazu gehören ACE-Hemmer, Angiotensin-II-Rezeptorantagonisten (AT1R-Blocker), Mineralcorticoidrezeptor-Antagonisten und direkte Renininhibitoren.

Die medikamentöse Dämpfung des RAAS über ACE-Hemmer ist heute ein wichtiges Prinzip bei der Behandlung der arteriellen Hypertonie, der chronischen Herzinsuffizienz, nach Myokardinfarkt und bei diabetischer Nephropathie. Neben der Blockade der Bildung von Angiotensin II wird auch der Abbau des vasodilatorischen Bradykinin gehemmt. Da Angiotensin II zu den Wachstumsfaktoren für Fibroblasten und Myozyten zählt, blockieren ACE-Hemmer die Angiotensin II induzierte Myokard- und Gefäßhypertrophie bei hypertensiver Herzkrankheit und verhindern das Remodeling nach einem Myokardinfarkt.

Angiotensin-II-Rezeptorantagonisten (=Sartane) sind selektive Antagonisten der AT1-Rezeptoren. Sie werden gegen arterielle Hypertonie und bei chronischer Herzinsuffizienz eingesetzt, wenn die Gabe von ACE-Hemmern aufgrund von Nebenwirkungen nicht möglich ist. Sie wirken wie ACE-Hemmer nephroprotektiv. Durch sie wird bei Nierenerkrankungen eine Proteinurie sowie eine Progression der Erkrankung vermindert (Karow et al. 2013).

## **4. Material und Methoden**

### **4.1 Studienaufbau und Patientenkollektive**

Alle Patientendaten wurden in der Medizinischen Klinik III und Poliklinik der Universitätsklinik Giessen erhoben. Zuvor wurde am 10.5.2007 die Einwilligung der Ethikkommission unter dem Aktenzeichen 54/07 eingeholt. Außerdem wurde eine Einverständniserklärung der Patienten eingeholt.

#### **Gruppe 1a und b:**

Es wurden Daten einer bestehenden Gruppe aus 58 Typ 1 Diabetikern verwendet. Diese Daten wurden für eine Studie von 2001 bis 2006 von Dr. Britta Fischer erhoben und im Rahmen dieser Studie ergänzt. Die Laborparameter wurden durch das Zentrallabor der Universitätsklinik Giessen ausgewertet.

Zusätzlich zu den bestehenden Daten erfolgte die Vervollständigung durch Aktenrecherche und die Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Bestimmung der Insertion/Deletion-Polymorphismen des ACE-Gens.

Die Endauswertung erfolgte mit 36 der Patienten als Gruppe 1a. Ausgeschlossen wurden Patienten, die einen ACE-Hemmer oder einen AT1R-Blocker einnahmen und Patienten mit unvollständiger Datenreihe.

Davon wurde bei 15 Patienten zusätzlich der auf den Blutzucker bezogene Glukagonwert (Glukagon/BZ) ermittelt. Diese Gruppe bildet die Gruppe 1b. Bei 10 dieser Patienten erfolgte die Bestimmung des Glukagon/BZ durch einen standardisierten Clamp-Test im Rahmen früherer Studien. Bei 5 Patienten erfolgte eine Nüchternblutabnahme mit der Bestimmung des Glukagons im Labor der Medizinischen Klinik III im Rahmen dieser Studie.

#### **Gruppe 2:**

Die Daten wurden für diese Studie im Zeitraum von 2007 bis 2009 erhoben. Es wurde eine Gruppe als Kontrollgruppe mit 22 Nichtdiabetikern erstellt. Probanden mit einer ACE-Hemmer- oder AT1R-Blocker-Einnahme wurden ausgeschlossen und die Kontrollgruppe mit 12 Patienten ausgewertet. Nach einer Einverständniserklärung



wurde eine Nüchternblutabnahme durchgeführt und Laborwerte im Zentrallabor und im Labor der Medizinischen Klinik III bestimmt. Es erfolgte die Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Bestimmung der Insertion/Deletion-Polymorphismen des ACE-Gens sowie die Bestimmung des Glukagon-Wertes.

## **4.2 Datenerhebung**

### **4.2.1 Gruppe 1**

#### **4.2.1.1 Labordiagnostik**

Die Bestimmung des C-Peptids, des Nüchternblutzuckers, des Plasma-ACE wurde im Zentrallabor des Universitätsklinikum Giessen durchgeführt.

##### **I: C-Peptid:**

Insulin wird in den Betazellen aus den Vorstufen Präproinsulin und Proinsulin gebildet. Aus der Mitte der Molekülkette des Proinsulins wird das C-Peptid (connecting-peptide) abgespalten und mit dem Insulin äquimolar und zeitgleich ins Blut abgegeben. Dies macht das C-Peptid zu einem guten Parameter um die Funktion der Betazellen zu beurteilen. Außerdem hat es eine längere Halbwertszeit als das Insulin und ist dadurch nicht wie dieses durch kurzfristige Schwankungen der Synthese beeinflusst. Weitere Vorteile der C-Peptid-Messung gegenüber der direkten Insulinspiegelmessung sind das Fehlen von Kreuzreaktionen mit Insulinantikörpern und der fehlende Einfluss auf die Werte durch exogene Insulinzufuhr. (Herold et al. 2016)

Um das C-Peptid zu bestimmen wurde eine Nüchternblutabnahme mit einer Lithium-Heparinat-Monovette durchgeführt. Im Zentrallabor wurde der Wert durch einen Lumineszenz Immunoassay ermittelt.

Referenzwerte: 0,9-4,0 ng/ml

##### **II: Nüchternblutzucker:**

Der Nüchternblutzucker (NBZ) gibt die Konzentration der Glukose im Blut nach einer Zeit von 8 Stunden ohne Nahrungsaufnahme an und ist ein entscheidender Test für die Diagnose eines Diabetes mellitus und ist wichtig für die Therapiekontrolle.

Im Rahmen dieser Studie wurde das Blut zur Bestimmung des NBZ mit einer EDTA-Monovette abgenommen.

Im Zentrallabor erfolgt die Ermittlung des Wertes durch Photometrie.

Referenzbereich für Erwachsene: m: 70 -110 mg/dl; w: 60-110 mg/dl

### **III: Plasma-ACE**

Mehr zum ACE-Wert siehe Kapitel 3.4.1

Zur Bestimmung des Plasma-ACE wurde Blut mit einer Serum-Monovette abgenommen und im Zentrallabor mittels Photometrie bestimmt.

Referenzbereich für Erwachsene: 18-55 U/l

### **IV: Glukagon, Glukagon/BZ:**

#### **A: Standardisierter Clamp-Test (10 Patienten)**

Der auf den Blutzucker bezogene Glukagonwert wurde durch einen standardisierten Clamp-Test in der Medizinischen Klinik III ermittelt. Die Patienten wurden am Abend zuvor stationär aufgenommen und der Blutzucker nachts alle zwei Stunden überprüft und angepasst, um eine möglichst Normnahe Blutzuckereinstellung zu gewährleisten. Der Glukagonwert (CosmoBio, Glukagon EIA, VK 5%, Range 50-10000 pg/ml) und der Blutzucker wurden um 8 Uhr morgens nüchtern direkt nach der nächtlichen Ruhephase abgenommen.

#### **B: Selbstständige Glukagon-Bestimmung (5 Patienten)**

Es erfolgte morgens eine Nüchternblutabnahme mit einer Serummonovette. Diese wurde 15 Minuten mit 15000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipetiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei - 80 °C deponiert.

Im Labor der Medizinischen Klinik III wurde aus dem Überstand des zentrifugierten Serum der Glukagonwert mit dem Glukagon EIA kit der Firma Yanaihara folgendermaßen bestimmt:

Zunächst wurden die Proben und die Reagenzien auf Zimmertemperatur gebracht. 100µl von jeder Standardlösung (0, 41, 123, 370, 1111, 3333, 10000 pg Glukagon /ml) und 100µl von jeder Probe wurden in je ein Wells einer Mikrotiterplatte pipetiert und anschließend 50µl eines markierten Antigens hinzugegeben. Die Platte wurde mit einer Klebefolie abgedeckt und über Nacht (20-24 Stunden) bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Klebefolie abgenommen, die Lösung aus den Wells abgesaugt und die

Wells dreimal mit etwa 0,3 ml/Well Waschlösung gewaschen. Anschliessend wurden 100µl einer SA-HRP Lösung in die Wells gegeben. Die Platte wurde erneut mit Klebefolie abgedeckt und während sie auf einem Plattenrotator gedreht wurde bei Raumtemperatur (20-30°C) für eine Stunde inkubiert. Die Lösung in den Wells wurde danach wieder abgesaugt und die Wells erneut dreimal mit etwa 0,3 ml/Well Waschlösung gewaschen. Es wurden 100µl einer Substratlösung in jedes Wells gegeben und die Platte mit einer Klebefolie wieder abgedeckt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion in den Wells wurde danach durch Zugabe von 100µl Stopplösung beendet und die optische Dichte der Wells bei 490nm mit einem Photometer bestimmt. Die Werte der optischen Dichte der Wells mit den Standardlösungen wurden auf ein semilogarithmisches Papier aufgetragen und somit eine Standardkurve (Abszisse: Glukagonkonzentration des Standards; Ordinate: Werte der Dichte) erstellt. Diese wurde anschließend dazu verwendet die Glukagonkonzentrationen der Proben anhand ihrer Dichtewerte abzulesen.  
Referenzwerte: 60-200 pg/ml

#### **C: Bildung des Quotienten aus Glukagon und dem Nüchternblutzucker**

Glukagon und Blutzucker wurden wie oben beschrieben in folgenden Einheiten bestimmt und der Quotient gebildet:

Glukagon pg/ml und Blutzucker mg/dl

#### **IV: Bestimmung von GAD-Antikörpern**

Der Nachweis von Glutaminsäuredecarboxylase-Antikörpern (Anti-GAD-AK (GADA)) zeigt die immunologische Reaktion im Rahmen eines Diabetes mellitus Typ 1 auf. (s.o. Pathogenese DM Typ 1)

#### **4.2.1.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zur Bestimmung der I/D-Polymorphismen des ACE-Gen**

##### **I: Untersuchungsmaterial:**

Bei den Patienten wurde eine Nüchternblutabnahme mit einer EDTA-Monovette durchgeführt. Diese wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei – 20°C gelagert.

## **II: Extraktion und Aufreinigung der DNA**

Sinn dieses Vorganges ist es die DNA aus den Blutzellen zu extrahieren und die aus den Zellkernen freigesetzte DNA von Proteinverunreinigungen zu befreien. Durch Behandlung der Zellen mit Detergenzien werden diese aufgeschlossen und die Zellkerne durch Zentrifugation angereichert. Aus diesen wird anhand der Proteinase K die DNA freigesetzt und mit Ethanol ausgefällt. (Dörner et al. 2003)

Zur Aufreinigung der DNA aus dem Blut in der EDTA-Monovette wurde das DNA Mini kit der Firma QIAamp verwendet.

Dieses enthält:

Sammeltubes

QIAamp Spinsäulen

Buffer AL

Buffer ATL

Buffer AW1

Buffer AW2

Buffer AE

Proteinase K

Zusätzlich verwendet:

Ethanol (96%)

### **Durchführung:**

Zur Vorbereitung wurden die Blutproben der Patienten und ein Aliquot der Proteinase K auf Raumtemperatur gebracht und ein Heizblock auf 56°C eingestellt. Zunächst wurden 20µl der Proteinase K in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipetiert, 200µl des Vollblutes aus der EDTA-Monovette und anschließend 200µl des AL Buffer hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde etwa 15 Sekunden auf einem Vortex gut durchmischt und dann bei 56°C 10 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Reaktionsgefäße kurz anzentrifugiert um Kreuzkontaminationen durch Verspritzen von Probenflüssigkeit im Deckelinneren beim Öffnen der Gefäße zu vermeiden.

Anschließend wurden 200µl Ethanol zugegeben und die Probe wieder ca. 15 Sekunden auf einem Vortex gemischt und erneut zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen anzentrifugiert. Die Probe wurde dann vorsichtig, ohne den oberen Rand zu benetzen, auf die QIAamp Spinsäule (in einem 2-ml-Sammeltube) aufgetragen. Der Deckel wurde geschlossen und die Spinsäule in dem Sammel tube für 1 Minute bei 8000 rpm

zentrifugiert. Die Spinsäule wurde anschließend in ein sauberes 2-ml-Sammeltube gesetzt und das benutzte Gefäß mitsamt des Filtrats verworfen. Danach wurden 500µl des AW1 Buffer auf die Säule pipetiert und diese erneut für 1 Minute mit 8000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde dann wieder in ein neues Sammel tube gestellt während das benutzte Gefäß mit dem Filtrat wieder verworfen wurde. Anschließend wurde auf die Säule 500µl des AW2 Buffer aufgetragen und diese danach diesmal für 3 Minuten mit 14000 rpm zentrifugiert. Nachdem die Säule dann erneut in ein neues Sammel tube gestellt wurde, wurde sie direkt 1 Minute mit 14000 rpm zentrifugiert. Dieses Sammel tube wurde wieder verworfen und die Säule in ein autoklaviertes Eppendorf-Gefäß gesetzt. Es wurden 125 µl des AE Buffer auf die Säule gegeben und dies in dem Eppendorf-Gefäß nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur für 1 Minute mit 8000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend verworfen und die Proben bei 4°C in den Eppendorf-Reaktionsgefäßen aufbewahrt.

Die mit QIAamp Kits gereinigte DNA ist bis zu 50 kb groß, wobei Fragmente von 20–30 kb überwiegen. Aus 200 µl Blut werden 6 µl Gesamt-DNA isoliert, wobei die Ausbeute mit verlängerter Inkubation mit AE Buffer unter Raumtemperatur steigt.

### III: PCR-Ansatz

- 36µl    **H<sub>2</sub>O** (Aqua B. Braun)
- 5µl     **10XPCR Puffer** (Applied Biosystems, Roche®)
- 3µl     **MgCl<sub>2</sub>** (Applied Biosystems, Roche®, 25mM)
- 1µl     **HACE up Primer (Deletion)** (MWG-Biotech AG, 5-GCC CTG CAG GTG  
TCT GCA GCA TGT-3)  
bzw  
**HACE-ins-up (Insertion)** (MWG-Biotech AG, 5-TGG GAC CAC AGC GCC  
CGC CAC TAC-3)
- 1µl     **HACE down Primer (Deletion)** (MWG Biotech AG, 5-GGA TGG CTC TCC  
CCG CCT TGT CTC-3)  
bzw  
**HACE-ins-down (Insertion)** (MWG Biotech AG, 5-TCG CCA GCC CTC  
CCA TGC CCA TAA-3)
- 4µl     **dNTPs** (Carl Roth&Co KG, Roti-Mix, 2mM Lösung, >98%, pH8,5)
- 0,5µl   **Polymerase** (Applied Biosystems, AmpliTaq® Gold DNA Polymerase,  
5U/ml)
- 2µl     **DNA**

Die PCR-Ansätze wurden in einem DNA-freien Raum gemischt und die DNA in einem anderen Raum hinzugegeben.

Mit jeder DNA-Probe wurden zwei verschiedene Ansätze angefertigt. Die Grundzusammensetzung dieser zwei Ansätze war gleich, jedoch mit unterschiedlichen HACE up und Down Primern. Zur Amplifikation der Sequenz der Deletion wurde der HACE-up und -down Primer und zur Ermittlung der Insertions-Sequenz der HACE-ins-up und -down Primer verwendet.

#### **IV: Amplifikation der DNA**

Nach Mischen des PCR-Ansatzes erfolgte im Thermocycler die PCR als Amplifikationsverfahren für Nukleinsäuren.

Sie verläuft in mehreren Zyklen, was zu einer exponentiellen Anreicherung der amplifizierten Sequenz führt. (Dörner et al. 2003) Jeder Zyklus läuft in mehreren Schritten ab. Im ersten Schritt werden die DNA-Doppelstränge voneinander gelöst (melting), so dass sie als Einzelstränge vorliegen. Im zweiten Schritt binden die beiden für das PCR-Produkt spezifischen Primer (aus 15-20 Basenpaaren bestehende Oligonukleotide) an die jeweiligen Einzelstränge und dienen als Ausgangspunkte für die Synthese in 5'→3' Richtung (annealing). Im dritten Schritt vervollständigt eine hitzeresistente DNA-Polymerase aus thermophilen Bakterien die Einzelstränge zu Doppelsträngen mittels Anbau von Nukleotiden (extension / Synthese), so dass am Ende eines Zyklus die gewünschte DNA-Sequenz verdoppelt worden ist. Bei hohen Temperaturen wird dann der neu gebildete Strang (Denaturierung) abgelöst. Die Temperatur- und Zeitparameter werden für die jeweiligen Primer und Zielsequenzen optimiert.

HACE-Programm zur Amplifikation der Deletions-Sequenz:

10min	94°C	
15sec	94°C	
30sec	65°C	
90sec	72°C	+3sec/Cycle
5min	72°C	
35 Zyklen		

HACE-ins-Programm zur Amplifikation der Insertions-Sequenz:

10min 94°C

15sec 94°C

30sec 67°C

60sec 72°C +3sec/Cycle

5min 72°C

35 Zyklen

### **V: Gelelektrophorese**

Die zwei verschiedenen PCR-Produkte, Insertion und Deletion, wurden anhand ihrer Größe durch eine Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen. Je nach Größe der DNA-Fragmente, also je nach Anzahl an Basenpaaren, wandern diese unterschiedlich schnell vom negativen zum positiven Pol. Die kleineren Fragmente wandern schneller durch die Gelporen als die größeren.

Hier wurden zwei verschiedene Methoden A+B verwendet. Methode A wurde in der Medizinischen Klinik III und Methode B in Kinderklinik des Universitätsklinikums Giessen durchgeführt.

#### **Methode A mit SYBR®Green:**

Die Anfertigung des Gels, sowie die gesamte Gelelektrophorese, wurde in einem Labor mit Sicherheitsstufe 1 durchgeführt.

Gel:

Es wurden 50ml TBE-Puffer (20% 5xTBE-Puffer (Eppendorf®), 80% steriles H<sub>2</sub>O (Aqua B. Braun)) mit 0,75g Agarose (Quatex Lowmelt Agarose) in der Mikrowelle aufgeköcht und 5 µl SYBR®Green dazugegeben. Das Gel wurde in einen Rahmen mit zwei Kämmen mit je 11 Zähnen gegossen und mindestens zwei Stunden belassen um fest zu werden.

Die Kämmen wurden entfernt und der Rahmen mit dem fest gewordenen Gel in die Elektrophorese-Kammer (Firma: Kentz) gesetzt. Die Kammer wurde mit dem bereits oben verwendeten TBE-Buffer aufgefüllt und der Rahmen mit dem Gel vollständig damit bedeckt. Die durch die Kämmen erzeugten Vertiefungen im Gel wurden anschließend folgendermaßen beladen: In die erste Vertiefung wurde 10µl des DNA-Leiters und 2µl des Markers pipetiert. Die restlichen Kammern wurden mit 8µl PCR-

Produkt und 2µl des Markers beladen. Zwei der Vertiefungen enthielten das PCR-Produkt eines positiven oder eines negativen Kontrollansatzes.

Anschließend wurde in der Elektrophorese-Kammer ein elektrisches Feld mit 80V und 120mA für 90 Minuten mittels eines Generators (Consert E452) erzeugt.

Die durch das SYBR®Green gebundene DNA wurde durch ein Geldokumentations-System (Vilber Couramt®, Infinity3000) mit UV-Licht als Banden sichtbar gemacht und entweder mit oder ohne Analysesoftware ausgewertet.

Auswertung:

Betrachtet wurde zu jedem Patient jeweils das Gel mit dem Insertions- und das mit dem Deletions-PCR-Produkt. Eine Bande bei 319bp auf dem Deletions-Gel wies das Vorhandensein der Deletions-Sequenz nach, ein Fehlen dieser Bande schloss dies aus. Das gleiche Verfahren mit dem Vorhandensein oder Fehlen einer Bande bei 595bp wurde für das Insertions-Gel zum Nachweis der Insertions-Sequenz angewandt.

#### **Methode B mit Ethidiumbromid:**

Hierzu stellten wir, wie oben beschrieben, ein 1,5%iges Agarosegel aus 0,75 mg Agarose (Peq GOLD Universal Agarose Lot.Nr. 203433 Peq Lab) und 50 ml TBE-Puffer (Konzentration 200:800; Buffer Lot.Nr.: U104142N, Aqua B.Braun Ecotainer Spüllösung) her. Wie oben beschrieben wurde der Rahmen mit dem Gel in die Elektrophorese-Kammer (Firma: Kentz) gesetzt und mit TBE-Puffer bedeckt. In die erste Vertiefung wurde 6µl H<sub>2</sub>O und 10µl des bereits oben verwendeten Leiters pipetiert. Die Restlichen wurden mit 8µl PCR-Produkt und 2µl des Markers beladen. Zwei der Vertiefungen enthielten das PCR-Produkt eines positiven oder eines negativen Kontrollansatzes. Anschließend wurde ein elektrisches Feld mit 80V und 120mA erzeugt. Nach 1,5 Stunden wurde das Gel für 10 Minuten in einem Ethidiumbromidbad (Qbiogene EUROPE, Molecular biology grade, Catalog # ETBC1001, Lot # 746A9527, Volume # 10 ml, Formula: C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>BrN<sub>3</sub>, MW : 394,32) mit einer Konzentration von 1ml/ml, danach 10 Minuten im Wasserbad gebadet. Die nun gefärbten Banden wurden mit einem Polaroidsofortfilm abfotografiert und ausgewertet.

Auswertung:

Zunächst wurde nur das Gel des Deletions-PCR-Produkts betrachtet. War nach einer HACE-PCR eine Bande bei 319 bp sichtbar, wurde dies als Vorhandensein der Deletions-Sequenz und bei 595 bp als Vorhandensein der Insertions-Sequenz gewertet.



Ein Patient mit beiden Banden war somit ein ID-Typ. Wurde keine Bande bei 597 bp, sondern nur bei 319 bp sichtbar, wurde das Gel nach einer HACE-INS-PCR betrachtet. Eine Bande bei 335 bp zeigte hier das Vorhandensein der Insertions-Sequenz auf. Der Patient, der wie beschrieben eine Bande bei 319 bp und eine bei 335 bp aufzeigt, hat somit einen ID-Typ. Wurde im Gel der HACE-INS-PCR keine Bande sichtbar musste man von einem DD-Typ ausgehen. Ein Patient vom II-Typ hat im Rückschluss keine Bande bei 319 bp, aber entweder bei 597 bp oder 335 bp.

#### **4.2.1.3 Weitere Daten**

Durch Befragung der Patienten oder durch Einsehen der Arztbriefe wurden folgende Daten ermittelt:

##### **I: BMI**

Aus dem Körpergewicht in kg und der Körpergröße in m wird folgendermaßen der BMI errechnet:

$$\text{kg/m}^2 = \text{BMI}$$

##### **II: Medikamenteneinnahme**

In der Studie relevant ist die Einnahme von ACE-Hemmern oder AT1R-Blockern.

##### **II: Datum der Diagnosestellung des Diabetes**

Durch Befragung der Patienten oder durch Einsehen alter Arztbriefe wurde das Datum der Diagnose des Diabetes mellitus ermittelt und die Zeit bis zur Messung der C-Peptid-Werte errechnet.

### **4.2.2 Gruppe 2**

Die Datenerhebung bestand zum einen aus der Verarbeitung einer Nüchternblutabnahme und aus der Ermittlung weiterer Daten durch Befragung der Patienten.

#### **4.2.2.1 Labordiagnostik**

C-Peptid, Nüchternblutzucker, ACE-Wert, HbA1c wurden wie oben beschrieben ermittelt.

Glukagon wurde im Labor der Medizinischen Klinik III wie oben beschrieben und dann der Quotient mit dem Nüchternblutzucker gebildet. Die Durchführung der PCR zur

Bestimmung der ACE-Polymorphismen erfolgte auch im Labor der Medizinischen Klinik III.

#### **4.2.2.2 Weitere Daten**

BMI, Medikamenteneinnahme und das Datum der Diagnosestellung wurden wie oben beschrieben ermittelt.

### **4.3 Statistische Analyse**

Die Darstellung und Berechnung der Daten erfolgte unter Verwendung des Statistikprogramms Prism 4 for Macintosh, Version 4.0 a 2003 mit Hilfe von Frau Dr. Britta Fischer. Die Daten wurden mittels linearer Regression untersucht. Die Ergebnisse wurden im Streudiagramm dargestellt und es wurde das 95%-Konfidenzintervall des Regressionskoeffizienten angegeben.

## **5. Ergebnisse**

### **5.1. Gruppe 1a**

Die Endauswertung erfolgte mit 36 der Patienten als Gruppe 1a nach Ausschluss der Patienten, die einen ACE-Hemmer oder einen AT1R-Blocker einnahmen und Patienten mit unvollständiger Datenreihe.

#### **5.1.1. Deskriptive Statistik**

##### **5.1.1.1. Alter**

Das Alter der 36 untersuchten Patienten liegt zwischen 22 und 71 Jahren. Das mittlere Alter liegt bei 40,8 Jahren und der Median bei 42 Jahren (siehe Tab 4).

(Stand 2009)

##### **5.1.1.2 Geschlecht**

Von den untersuchten Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 sind 12 (33,33%) weiblich und 24 (66,66%) männlich (siehe Tab 5).

##### **5.1.1.3 Diabetesdauer**

Das Datum der Diagnose wurde bei 35 Patienten ermittelt. Die am kürzesten zurückliegende Diagnosestellung war vor 3 Jahren, die am längsten zurückliegende vor 20 Jahren. Der Mittelwert liegt bei 11,2 Jahren und der Median bei 11 Jahren (siehe Tab 4).

(Stand 2009)

##### **5.1.1.4 HbA1c**

Der HbA1c wurde bei 34 Typ 1 Diabetikern erfasst. Die Werte liegen dabei zwischen 5,3% und 9,2%. Der mittlere Wert beträgt 6,8% und der Median bei 6,55% (siehe Tab 4).

#### **5.1.1.5 BMI**

Der BMI-Wert wurde bei 19 Patienten ermittelt. Die Werte liegen zwischen 18,4 kg/m<sup>2</sup> und 30,9 kg/m<sup>2</sup>. Der mittlere Wert beträgt 23,1 kg/m<sup>2</sup> und der Median liegt bei 23 kg/m<sup>2</sup> (siehe Tab 4).

#### **5.1.1.6 C-Peptid**

Die Werte des C-Peptids wurden bei 36 Patienten ermittelt und liegen zwischen 0 ng/ml und 3,03 ng/ml. Der mittlere Wert liegt bei 0,63 ng/ml und der Median bei 0,45 ng/ml (siehe Tab 4).

#### **5.1.1.7 Dauer des Diabetes bis zur C-Peptid-Bestimmung**

Die Dauer des Diabetes bis zur Bestimmung des C-Peptids wurde bei 36 Patienten bestimmt. Die niedrigste Dauer lag bei 6 Monaten und die höchste bei 132 Monaten. Der mittlere Wert liegt bei 40,6 Monaten und der Median bei 33 Monaten (siehe Tab 4).

#### **5.1.1.8 ACE**

Der ACE-Wert wurde bei allen 36 Patienten bestimmt. Der niedrigste Wert lag bei 12 U/l und der höchste Wert bei 87 U/l. Der mittlere Wert liegt bei 47 U/l und der Median bei 48,5 U/l (siehe Tab 4).

#### **5.1.1.9 Vorhandensein von GAD-Antikörpern**

Die GAD-Antikörper wurden bei 27 Patienten bestimmt. Davon waren bei 23 Patienten Antikörper nachweisbar und bei 4 nicht.

#### **5.1.1.10 I/D-Polymorphismen**

Der I/D-Polymorphismus wurde bei 23 der 36 Typ 1 Diabetiker bestimmt. Der ID-Typ und der DD-Typ konnte je bei 10 (43,48%) bestimmt werden (siehe Tab 3, Abb 1). Den II-Polymorphismus trugen nur 3 (13,04%). Insgesamt kam das D-Allel (ID+DD) bei 20 und somit fast allen (86,96 %) der 23 untersuchten Typ 1 Diabetiker vor.

Tab 3: Verteilung der I/D-Polymorphismen der Typ 1 Diabetiker, Gruppe 1a

Parameter	n	DD	ID	II
I/D-Polymorphismen	23	10 (43,48%)	10 (43,48%)	3(13,04%)

Abb 1: Verteilung der Polymorphismen der Typ 1 Diabetiker, Gruppe 1a

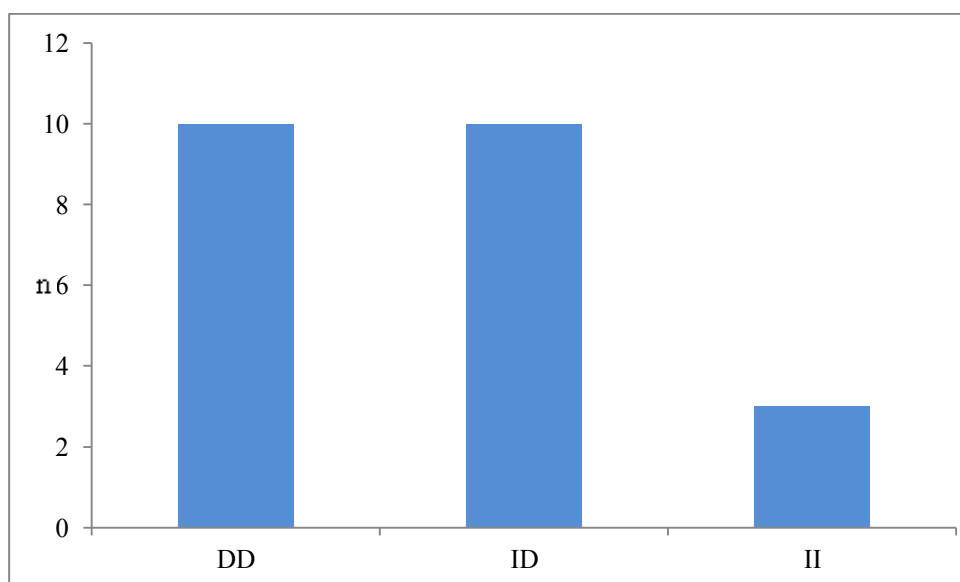
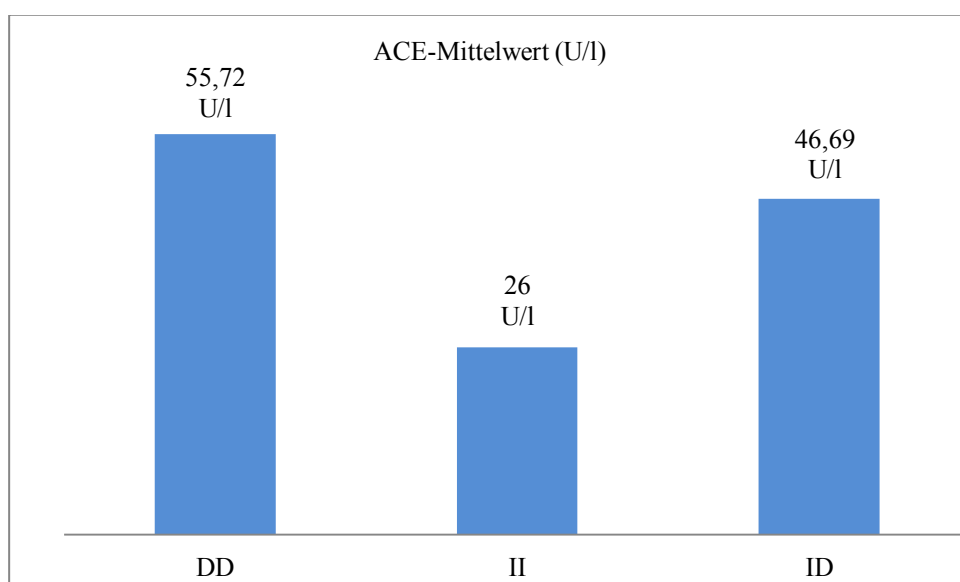


Abb 2: ACE-Mittelwerte (U/l) dem Polymorphismus zugeordnet der Gruppe 1a



Tab 4: Verteilung von Alter (Jahre, Stand 2009), Diabetesdauer (Jahre, Stand 2009), HbA1c (%), BMI ( $\text{kg/m}^2$ ), C-Peptid 1 und 2 (ng/ml), C-pep/BZ, Diabetesdauer bis C-Peptid (Monate) und ACE (U/l) der Typ 1 Diabetiker, Gruppe 1a

Parameter	n	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum
Alter (Jahre, 2009)	36	40,8	42	22	71
Diabetesdauer (Jahre, 2009)	35	11,2	11	3	20
HbA1c (%)	34	6,8	6,55	5,3	9,2
BMI ( $\text{kg/m}^2$ )	19	23,1	23	18,4	30,9
C-Peptid (ng/ml)	36	0,63	0,45	0	3,03
Dauer bis C-Peptid (Monate)	36	40,6	33	6	132
ACE (U/l)	36	47	48,5	12	87

Tab 5: Verteilung des Geschlechts der Typ 1 Diabetiker, Gruppe 1a

Parameter	n	weiblich	männlich
Geschlecht	36	12(33,33%)	24(66,66%)

## 5.1.2 Vergleiche und Korrelationen

### 5.1.2.1 Zusammenhang zwischen ACE und nach Zeiträumen zur Diagnosestellung unterteiltem C-Peptid

Um der Frage nachzugehen, ob eine höhere ACE-Aktivität zu einem schnelleren Rückgang der Betazellreserve und damit zu einem schnelleren Fortschreiten des Typ 1 Diabetes führt, wurde der Zusammenhang der ACE-Aktivität und der Höhe des C-Peptids in einem Zeitraum der Diabetesdauer unter 10 Jahren an insgesamt 36 Patienten untersucht.

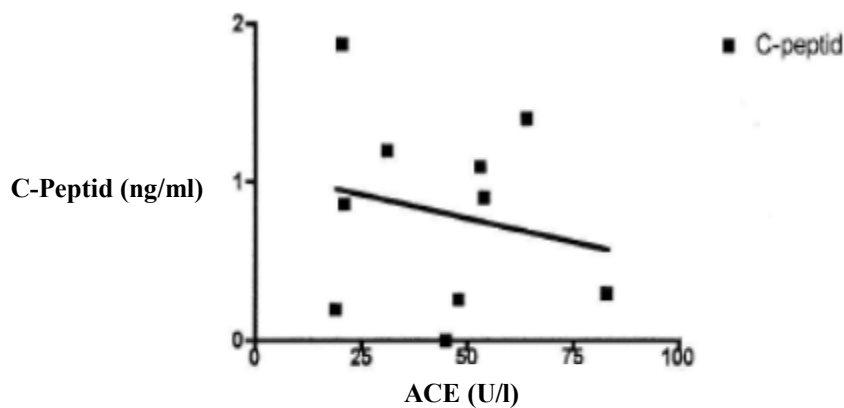
Im Test auf lineare Regression konnte kein signifikanter linearer Zusammenhang zwischen dem C-Peptid im Zeitraum von <18 Monaten nach Krankheitsbeginn mit der Höhe des ACE-Wertes dargestellt werden ( $p=0,5716$ ,  $r^2=0,04$ ,  $n=10$ ). Das 95%-

Konfidenzintervall des Regressionskoeffizienten lag bei  $b=-0,029$  bis  $0,017$  (siehe Abb 3).

So konnten auch bei einer Diabetesdauer  $<2$  ( $p=0,3297$ ,  $r^2=0,07$ ,  $n=15$ , 95%-Konfidenzintervall  $b=-0,031$  bis  $0,011$ ) (siehe Abb 4),  $<3$  ( $p=0,2697$ ,  $r^2=0,07$ ,  $n=19$ , 95%-Konfidenzintervall  $b=-0,03$  bis  $0,009$ ) (siehe Abb 5) und  $<5$  Jahren ( $p=0,3409$ ,  $r^2=0,03$ ,  $n=32$ , 95%-Konfidenzintervall  $b=-0,019$  bis  $0,007$ ) (siehe Abb 6) kein signifikanter linearer Zusammenhang festgestellt werden.

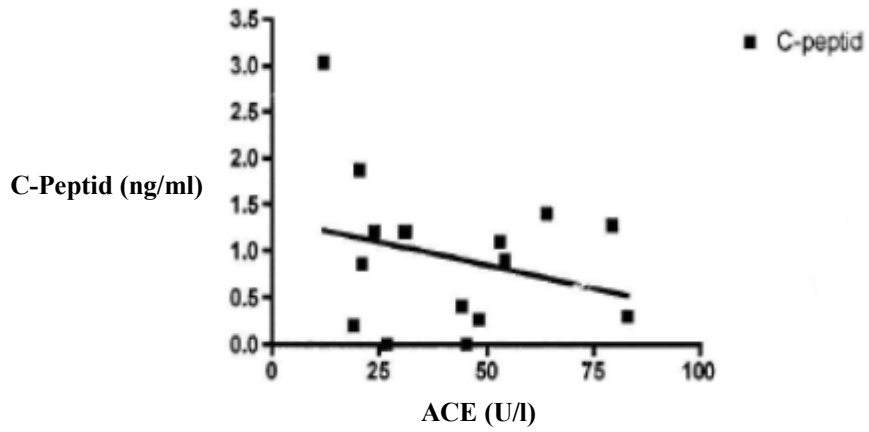
Auch in einem Zeitraum bis zu 10 Jahren nach Krankheitsbeginn konnte kein signifikanter linearer Zusammenhang festgestellt werden. ( $p=0,2597$ ,  $r^2=0,037$ ,  $n=36$ , 95%-Konfidenzintervall  $b=-0,019$  bis  $0,005$ ) (siehe Abb 7).

Abb 3: Diabetesdauer  $<18$  Monate, Zusammenhang C-Peptid (ng/ml) und ACE (U/l)



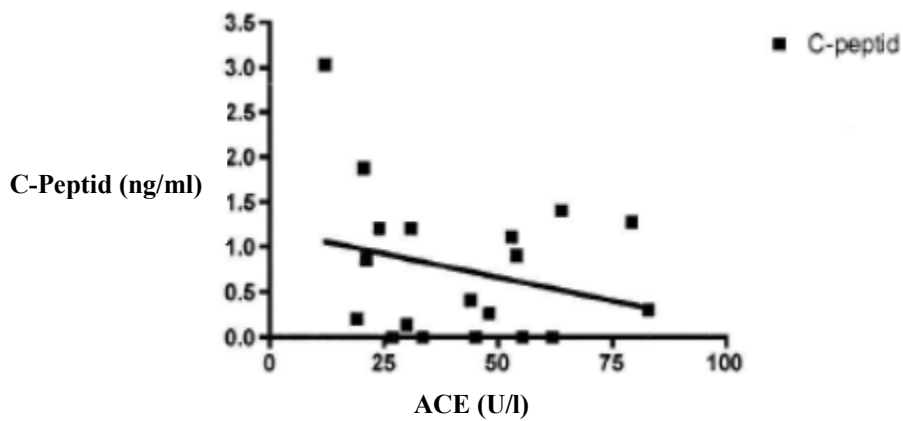
$p=0,5716$ ,  $r^2=0,04$ ,  $n=10$ , 95%-Konfidenzintervall  $b=-0,029$  bis  $0,017$

Abb 4: Diabetesdauer <2 Jahren, Zusammenhang C-Peptid (ng/ml) und ACE (U/l)



$p=0,3297$ ,  $r^2=0,07$ ,  $n=15$ , 95%-Konfidenzintervall  $b=-0,031$  bis  $0,011$

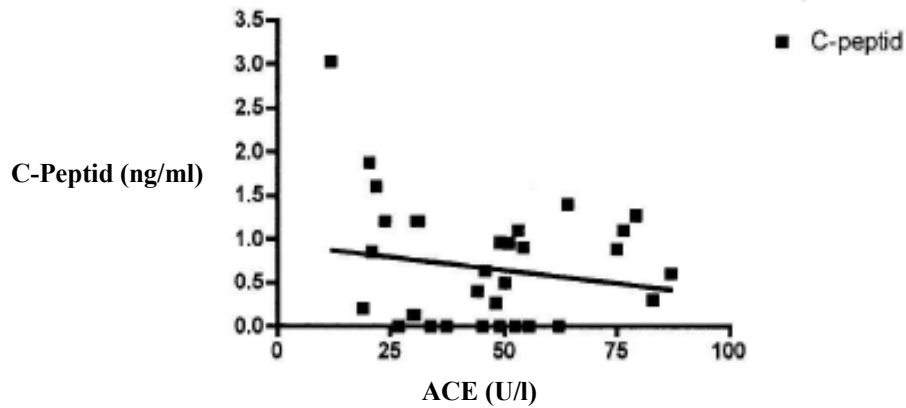
Abb 5: Diabetesdauer <3 Jahren, Zusammenhang C-Peptid (ng/ml) und ACE (U/l)



$p=0,2697$ ,  $r^2=0,07$ ,  $n=19$ , 95%-Konfidenzintervall  $b=-0,03$  bis  $0,009$

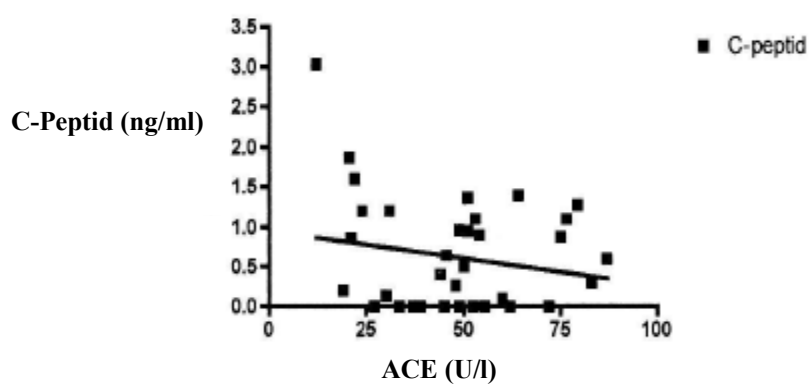


Abb 6: Diabetesdauer <5 Jahren, Zusammenhang C-Peptid (ng/ml) und ACE (U/l)



$p=0,3409$ ,  $r^2=0,03$ ,  $n=32$ , 95%-Konfidenzintervall  $b=-0,019$  bis  $0,007$

Abb 7: Diabetesdauer <10 Jahren, Zusammenhang C-Peptid (ng/ml) und ACE (U/l)



$p=0,2597$ ,  $r^2=0,037$ ,  $n=36$ , 95%-Konfidenzintervall  $b=-0,019$  bis  $0,005$

## **5.1.2 Gruppe 1b**

15 Patienten mit zusätzlicher Bestimmung des auf den Blutzucker bezogenen Glukagonwertes (Glukagon/BZ).

### **5.1.2.1 Deskriptive Statistik**

#### **5.1.2.1.1 Alter**

Das Alter der 15 untersuchten Patienten liegt zwischen dem 29 und 51 Jahren. Das mittlere Alter liegt bei 41,5 Jahren und der Median bei 44 Jahren (siehe Tab 7). (Stand 2009)

#### **5.1.2.1.2 Geschlecht**

Von den untersuchten Patienten sind 5 (33,33%) weiblich und 10 (66,66%) männlich (siehe Tab 8).

#### **5.1.2.1.3 Diabetesdauer**

Die Diabetesdauer wurde bei 15 Patienten bestimmt. Die geringste Dauer lag bei 3 Jahren, die längste bei 23 Jahren. Der Mittelwert lag bei 13,1 Jahren und der Median bei 13 Jahren (siehe Tab 7).

#### **5.1.2.1.4 HbA1c**

Der HbA1c wurde bei 14 Patienten bestimmt. Der niedrigste Wert lag bei 5,3%, der Höchste bei 9,2%, der Mittelwert bei 6,7% und der Median bei 6,25% (siehe Tab 7).

#### **5.1.2.1.5 BMI**

Der BMI wurde nur bei 4 Patienten bestimmt. Der niedrigere Wert liegt bei 19,9 kg/m<sup>2</sup> und der Höhere bei 26,5 kg/m<sup>2</sup>. Der Mittelwert liegt bei 22,98 kg/m<sup>2</sup> und Median liegt bei 22,75 kg/m<sup>2</sup> (siehe Tab 7).

#### **5.1.2.1.6 C-Peptid**

C-Peptid wurde bei allen 15 Patienten bestimmt. Der niedrigste Wert lag bei 0 ng/ml und der höchste Wert bei 1,87 ng/ml. Der Mittelwert wurde auf 0,54 ng/ml und der Median auf 0,3 ng/ml bestimmt (siehe Tab 7).

#### **5.1.2.1.7 Dauer des Diabetes bis zur C-Peptid-Bestimmung**

Die Dauer der Diabeteserkrankung bis zur C-Peptid-Bestimmung wurde bei 15 Patienten bestimmt. Die kürzeste Zeit lag bei 6 Monaten und die längste bei 372 Monaten. Der Mittelwert liegt bei 61,6 Monaten und der Median bei 36 Monaten (siehe Tab 7).

#### **5.1.2.1.8 ACE**

Der ACE-Wert wurde bei allen 15 Patienten bestimmt. Der niedrigste Wert lag bei 20,5 U/l und der höchste Wert bei 109 U/l. Der mittlere Wert liegt bei 56,19 U/l und der Median bei 51 U/l (siehe Tab 7).

#### **5.1.2.1.9 Glukagon/BZ**

Der Glukagon/BZ wurde bei 15 Patienten untersucht. Der niedrigste Wert lag bei 0,62 und der höchste Wert bei 3,2. Der mittlere Wert liegt bei 1,4 und der Median bei 1,06 (siehe Tab 7).

#### **5.1.2.1.10 GAD-Antikörper**

Die GAD-Antikörper wurden bei 12 Patienten bestimmt. Bei 9 Patienten lassen sich diese Antikörper nachweisen, bei 3 Patienten sind diese negativ (siehe Tab 7).

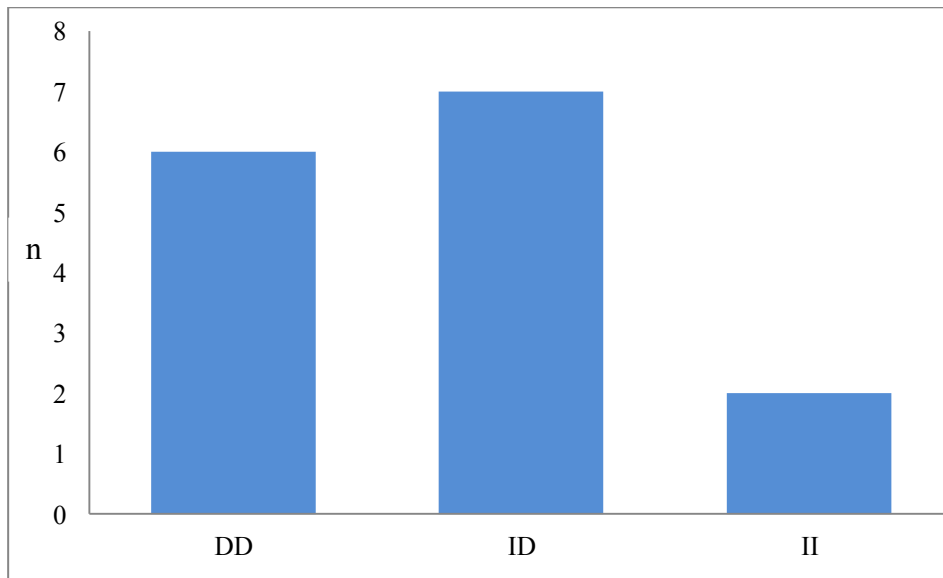
#### **5.1.2.1.11 Verteilung des I/D-Polymorphismus**

Der I/D-Polymorphismus wurde bei allen 15 der Patienten bestimmt. Der DD-Typ konnte bei 6 (40%), der II-Typ bei 2 (13,33%) und der ID-Typ bei 7 (46,66%) Patienten bestimmt werden (siehe Tab 6, Abb 8). Insgesamt kam das D-Allel (ID+DD) bei 13 und somit bei fast allen der 15 untersuchten Patienten vor.

Tab 6: Verteilung der I/D-Polymorphismen der Gruppe 1b

Parameter	n	DD	ID	II
I/D-Polymorphismen	15	6 (40%)	7 (46,66%)	2 (13,33%)

Abb 8: Verteilung der I/D-Polymorphismen der Gruppe 1b



Tab 7: Verteilung von Alter (Jahre), Glucagon/BZ, Diabetesdauer (Jahre), HbA1c (%), BMI (kg/m<sup>2</sup>), C-Peptid (ng/ml), Dauer bis C-Peptid (Monat), ACE (U/l) der Gruppe 1b

Parameter	n	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum
Alter (Jahren, 2009)	15	41,5	44	29	51
Glucagon/BZ	15	1,4	1,06	0,62	3,2
Diabetesdauer (Jahren, 2009)	15	13,1	13	3	23
HbA1c (%)	14	6,7	6,25	5,3	9,2
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	4	22,98	22,75	19,9	26,5
C-Peptid (ng/ml)	11	1,074	0,97	0	2,3

Dauer bis C-Peptid (Monate)	15	61,6	36	6	372
ACE (U/l)	15	56,19	51	20,5	109

Tab 8: Verteilung des Geschlechtes der Gruppe 1b

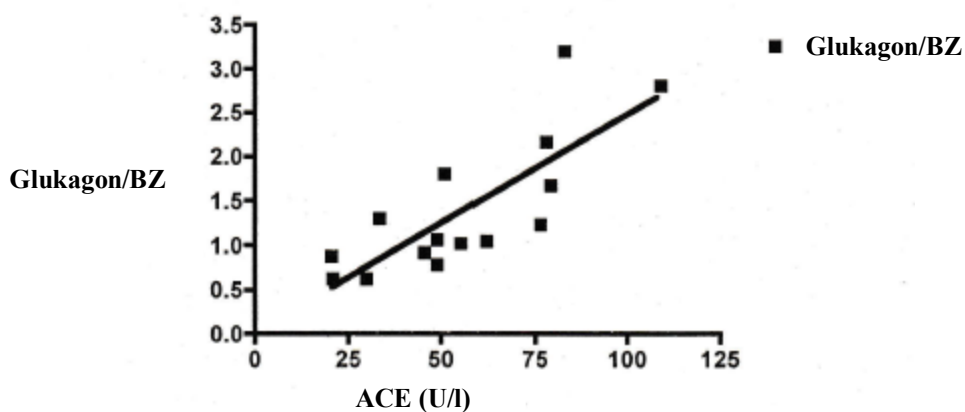
Parameter	n	männlich	weiblich
Geschlecht	15	10 (66,66%)	5 (33,33%)

### 5.1.2.2 Vergleiche und Korrelationen

#### 5.1.2.2.1 Zusammenhang zwischen dem Glukagon/BZ und dem ACE-Spiegel

Im Test auf lineare Regression zeigt sich ein signifikanter linearer Zusammenhang zwischen ACE-Aktivität und dem Nüchternglukagonwert bezogen auf den Blutzucker ( $p < 0,0001$ ,  $r^2 = 0,63$ ,  $n = 15$ ). Das 95%-Konfidenzintervall des Regressionskoeffizienten lag bei  $b = 0,013$  bis  $0,036$ . (siehe Abb 9)

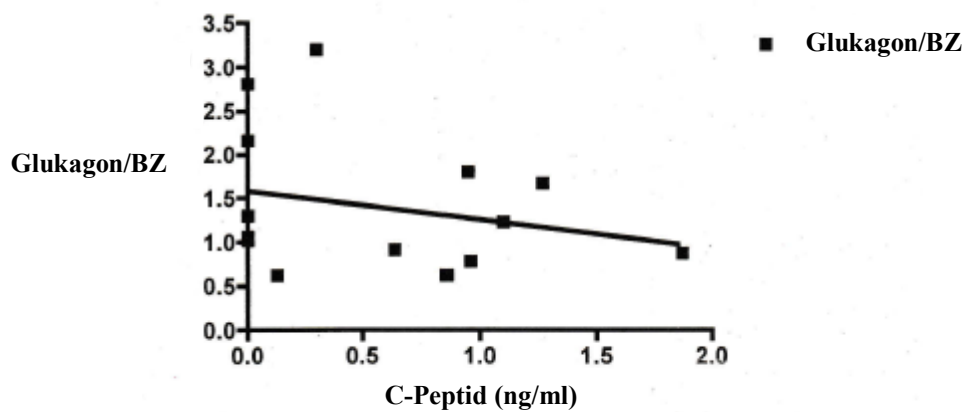
Abb 9: Glukagon/BZ und ACE (U/l)



$p < 0,0001$ ,  $r^2 = 0,63$ ,  $n = 15$ , 95%-Konfidenzintervall  $b = 0,013$  bis  $0,036$

Die Höhe des Glukagonwertes bezogen auf den Blutzucker korreliert nicht mit dem Nüchtern-C-Peptid ( $p = 0,37$ ,  $r^2 = 0,062$ ,  $n = 15$ ). Das 95%-Konfidenzintervall des Regressionskoeffizienten lag bei  $b = -1,083$  bis  $0,4309$ . (siehe Abb 10)

Abb 10: Glukagon/BZ und C-Peptid (ng/ml)



$p=0,37$ ,  $r^2=0,062$ ,  $n=15$ , 95%-Konfidenzintervall  $b=-1,083$  bis  $0,4309$

## 5.2 Kontrollgruppe

12 Nichtdiabetiker bilden die Vergleichsgruppe.

### 5.2.1 Deskriptive Statistik

#### 5.2.1.1 Alter

Das Alter wurde bei allen 12 Patienten der Kontrollgruppe bestimmt. Der jüngste dieser Gruppe ist 26 Jahre und der älteste 71 Jahre. Der Mittelwert liegt bei 41 Jahren und der Median bei 37 Jahren (siehe Tab 9).

#### 5.2.1.2 Geschlecht

Von den 12 Patienten sind 4 (33,3%) Männer und 8 (66,7%) Frauen. (siehe Tab 10)

#### 5.2.1.3 HbA1c

Der HbA1c wurde bei 12 Patienten ermittelt mit dem niedrigsten Wert bei 5,1% und dem höchsten bei 5,9%. Der Mittelwert liegt bei 5,6% und der Median bei 5,6% (siehe Tab 9).

#### 5.2.1.4 BMI

Der BMI ist bei 9 Patienten bekannt. Der niedrigste Wert liegt bei 19,1 kg/m<sup>2</sup> und der höchste bei 32,6 kg/m<sup>2</sup>. Der Mittelwert beträgt 25,2 kg/m<sup>2</sup> und der Median 24,1 kg/m<sup>2</sup> (siehe Tab 9).

#### 5.2.1.5 Glukagon

Der Glukagonwert wurde bei 17 Patienten ermittelt. Der niedrigste Wert beträgt 340 pg/ml und der höchste >3333 pg/ml. Der Mittelwert liegt bei 1602 pg/ml und der Median bei 1173 pg/ml (siehe Tab 9).

#### 5.2.1.6 C-Peptid

Das C-Peptid wurde bei allen 12 Patienten bestimmt. Der niedrigste Wert wurde mit 0,9 ng/ml und der höchste mit 8,8 ng/ml gemessen. Der Mittelwert beträgt 2,4 ng/ml und der Median 1,75 ng/ml (siehe Tab 9).

#### 5.2.1.7 ACE

Der ACE-Wert wurde bei 10 Patienten bestimmt. Der niedrigste Wert beträgt 22 U/l und der höchste 71 U/l. Der Mittelwert wurde auf 38,9 U/l und der Median auf 34 U/l berechnet (siehe Tab 9).

#### 5.2.1.8 Glukagon (pg/ml)/BZ(mg/dl)

Der Quotient aus Glukagon und Nüchternblutzucker wurde bei 11 Patienten gebildet. Der niedrigste Wert lag bei 3,9 und der höchste Wert 44,4. Der Mittelwert wurde auf 19,4 und der Median auf 14,7 bestimmt (siehe Tab 9).

Tab 9: Verteilung von Alter (Jahre), HbA1c (%), BMI (kg/m<sup>2</sup>), C-Peptid (ng/ml), ACE (U/l), Glukagonwerten (pg/ml) und Glukagon/BZ der Kontrollgruppe

Parameter	n	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum
Alter (Jahre, 2009)	12	41	37	26	71
HbA1c (%)	12	5,6	5,6	5,1	5,9
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	9	25,2	24,1	19,1	32,6

Glukagon (pg/ml)	17	1602	1173	330	<3333
C-Peptid (ng/ml)	12	2,4	1,75	0,9	8,8
Glukagon/BZ	11	19,4	14,7	3,9	44,4
ACE (U/l)	10	38,9	34	22	71

Tab 10: Verteilung des Geschlechtes der Kontrollgruppe

Parameter	n	männlich	weiblich
Geschlecht	12	4 (33,3%)	8 (66,7%)

### 5.2.1.9 I/D-Polymorphismen

Der ID-Polymorphismus konnte bei 4 (33,3%) und der DD-Polymorphismus bei 6 (50%) Patienten der 12 Probanden der Kontrollgruppe nachgewiesen werden (siehe Tab 12, Abb 11). Den II-Polymorphismus trugen 2 (16,7%). Insgesamt kam das D-Allel (ID+DD) bei 10 und somit bei der Mehrheit (83,3 %) der 12 untersuchten Personen vor.

Tab 12: Verteilung der I/D-Polymorphismen in der Kontrollgruppe

Parameter	n	DD	ID	II
I/D-Polymorphismen	12	6 (50%)	4 (33,3%)	2 (16,7%)



Abb 11: Verteilung der Polymorphismen in der Kontrollgruppe

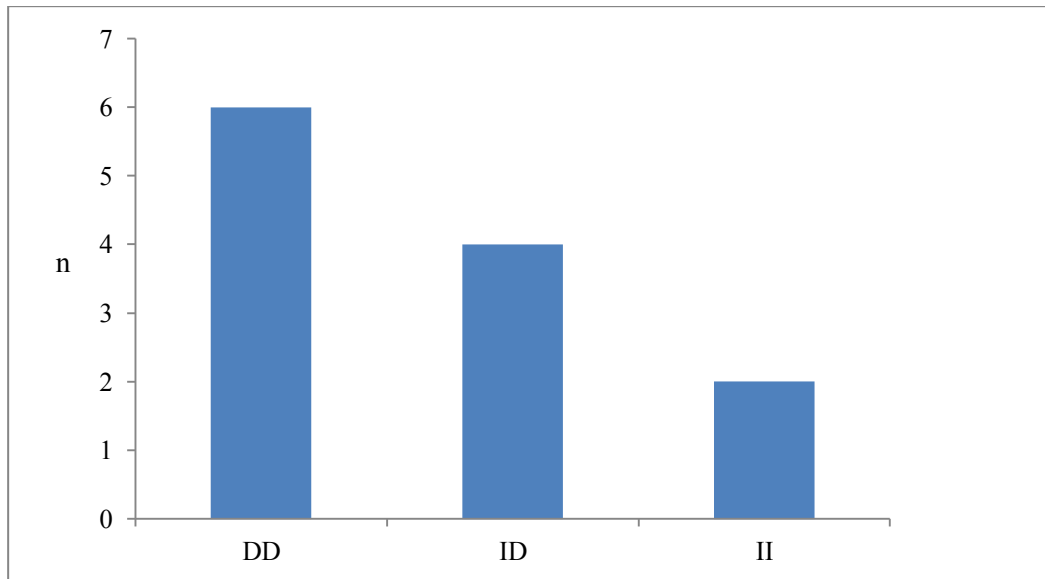
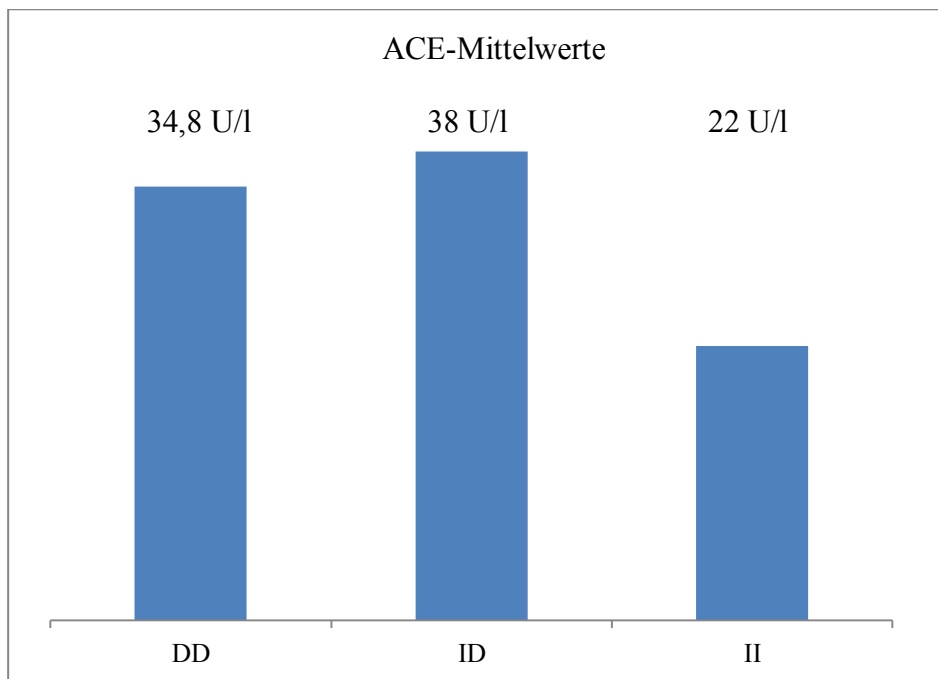


Abb 12: ACE-Mittelwerte (U/l) der Kontrollgruppe dem Polymorphismus zugeordnet



## **5.4. Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse**

Eine Frage dieser Studie lag darin, ob eine genetisch determinierte höhere ACE-Aktivität zu einem schnelleren Rückgang der Betazellreserve im Laufe eines Typ 1 Diabetes führt. Es kann kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem C-Peptid, als Marker der Betazellreserve, und der Höhe des ACE-Wertes gezeigt werden (siehe Abb 7). Dabei bringt auch die Aufteilung verschiedener Zeiträume der Diabetesdauer keinen signifikanten Zusammenhang (siehe Abb 3-6).

Bei einem Teil der Patienten wurde der Zusammenhang der ACE-Aktivität mit dem Glukagonspiegel untersucht. Hier zeige sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen ACE-Aktivität und dem Nüchternglukagonwert bezogen auf den Blutzucker (siehe Abb 9). Dabei korreliert die Höhe des Glukagonwertes bezogen auf den Blutzucker nicht mit dem Nüchtern-C-Peptid (siehe Abb 10).

## **6. Diskussion**

### **6.1 Einfluss der ACE-Aktivität auf die Betazelldysfunktion im Verlauf eines Diabetes mellitus Typ 1**

Der Diabetes mellitus Typ 1 ist durch einen absoluten Insulinmangel gekennzeichnet, der Folge einer Zerstörung der Betazellen der Langerhansschen Inseln ist (Herold et al. 2016). Überwiegend liegt ein immunologischer Pathomechanismus vor und als zugrundeliegender Mechanismus der Betazellzerstörung wird die Apoptose gesehen, welche durch die von Immunzellen produzierten Cytokine ausgelöst wird (Federici M. et al. 2001, Efanova I.B. et al. 1998 aus Donath M.Y. et al. 2003).

Die autoimmune Zerstörung der pankreatischen Betazellen verläuft zeitlich und graduell bei erwachsenen Typ 1 Diabetikern sehr unterschiedlich. Über die Ursache der interindividuellen Unterschiede in der Abnahme der Betazellreserve ist nur wenig bekannt. Eine Möglichkeit zu finden, die Betazellreserve so lange wie möglich zu erhalten, würde die Stoffwechseleinstellung vieler Typ 1 Diabetiker deutlich vereinfachen.

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist bekannt als ein im Blut zirkulierendes und systemisch wirkendes Hormonsystem und hat eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushaltes sowie des Blutdrucks (Peach M. 1977). Besonders relevant ist sein Produkt Angiotensin II, das neben weiteren wichtigen Aufgaben aus der Nebennierenrinde die Ausschüttung von Aldosteron bewirkt, welches in der Niere die Natrium- und Wasserrückresorption und die Kalium- und H<sup>+</sup>-Ausscheidung fördert (Golenhofen et al. 2000). Eine weitere Komponente ist das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE), welches aus Angiotensin I das Angiotensin II bildet und somit eine Schlüsselrolle im System spielt. Im Laufe der letzten 15 Jahre wurde zusätzlich zu dem systemischen RAAS ein lokales, im Gewebe verschiedener Organe gebildetes RAAS entdeckt. Es wurde im Herz-, Nieren-, Fett- und Pankreas-, Placenta-, Knochen- und Muskelgewebe gefunden, aber auch im Nerven-, Reproduktions-, Verdauungs- und Gefäßsystem (Paul M. et al. 2006 aus Leung P.S. 2007). Verschiedene Studien demonstrieren die Existenz verschiedener Komponenten eines lokalen RAAS in isolierten Pankreasinseln. So können R.D. Ramracheya et al. die Expressierung der AT1R-mRNA durch menschliche Betazellen demonstrieren. Sie stellen außerdem fest, dass humane Alpha- und Deltazellen sowie auch nicht-endokrine Zellen der Inseln den AT1R exprimieren (Ramracheya R.D. et al. 2006). H. Jahr et al. zeigen, dass ACE durch endokrines sowie exokrines Pankreasgewebe exprimiert wird (Jahr H., Fischer B. et al. 2006).

Beim Typ 1 Diabetes wird eine hochregulierte Expressierung und Aktivität des lokalen RAAS des endokrinen Pankreas demonstriert (Tikellis C., Cooper M.E. 2006).

Durch die beschriebenen Erkenntnisse ist zu vermuten, dass die Aktivität des lokalen RAAS einen Einfluss auf den Verlauf der Betazellfunktion im Rahmen eines Typ 1 Diabetes hat. Dies ist die Fragestellung der vorliegenden Studie. Als Indikator für die Aktivität des lokalen RAAS wurde der ACE-Wert im Plasma untersucht. Die Betazellfunktion wurde durch das C-Peptid gemessen. Der C-Peptid-Wert wurde bei 58 Typ 1 Diabetikern mehrmals im Verlauf ihrer Erkrankung gemessen. Die Endauswertung erfolgte mit 36 Patienten, da Patienten mit einer medikamentösen RAAS-Blockade und unvollständiger Datenreihe ausgeschlossen wurden. Das Patientenkollektiv wurde nach unterschiedlicher Dauer von der Diagnose bis zur C-Peptid-Messung in Gruppen unterteilt. In allen Zeiträumen (<18 Monaten, <2 Jahren, <3 Jahren, <5 Jahren und <10 Jahren) kann kein Zusammenhang zwischen dem C-Peptid und der Höhe des ACE-Wertes gezeigt werden (siehe Abb 3-7). Anhand der

Ergebnisse kann hier somit kein signifikanter Zusammenhang zwischen der ACE-Aktivität und dem Verlauf der Betazellfunktion festgestellt werden.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen gibt es andere Studien, die einen Zusammenhang zwischen der Aktivität des lokalen RAAS und dem Fortschreiten eines Typ 1 Diabetes erkennen lassen. Studien haben gezeigt, dass Angiotensin II durch den AT1-Rezeptor die Produktion des monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) stimuliert und dadurch eine inflammatorische Reaktion in den Inseln und Betazellen auslöst (Chipitsyna G. et al. 2007). Schon ab dem Alter von 2 Wochen werden in den diabetischen Pankreata von non-obese-diabetic (NOD) Mäusen ACE-mRNA und -Protein nachgewiesen. Die Entwicklung einer Insulitis und die Progression zur Hyperglykämie sowie die Betazellzerstörung korrelieren mit erhöhten ACE-Werten (Chipitsyna G. et al. 2007).

In Zusammenhang mit dem Diabetes mellitus Typ 2 gibt es bisher mehrere Untersuchungen, die einen Einfluss des RAAS untersuchen. Bei Patienten mit Hypertonie und chronischer Herzinsuffizienz wird durch die Behandlung mit ACE-Hemmern und Angiotensin II-Rezeptorblockern der Entwicklung eines Typ 2 Diabetes vorgebeugt (Scheen A.J. et al. 2004 aus Leung P.S. et al. 2007). Eine große Metaanalyse zeigt, dass das durchschnittliche Risiko zur Entwicklung eines Typ 2 Diabetes unter ACE-Hemmern um 27%, unter ATII-Rezeptorblockern um 23% und insgesamt um 25% bei ihnen gesenkt werden kann (Abuissa H. et al. 2005 aus Leung P.S. et al. 2007). Wie das lokale RAAS seinen Einfluss nehmen könnte, bleibt auch hier noch unklar, jedoch gibt es verschiedene Hinweise, die auf einen möglichen Mechanismus deuten könnten.

Im Rahmen der vorliegenden retrospektiven Studie ist das C-Peptid zu unterschiedlichen Zeiten im Krankheitsverlauf eines Typ 1 Diabetes gemessen worden. Es waren 10 Patienten mit einer Diabetesdauer unter 18 Monaten und 19 Patienten unter 3 Jahren. Eine nur noch geringe Funktion der Betazellen ist bei den meisten zu erwarten. Dementsprechend liegt der mittlere C-Peptid-Wert bei 0,63 ng/ml. Eine prospektive Studie mit langer Beobachtungszeit, die Patienten zu Beginn ihrer Erkrankung einschließen, ist wünschenswert.

Betrachtet man eine aktuelle Studie von Schüler et al., wird bei gesunden, schlanken Menschen eine Verteilung von II 33%, ID 47% und DD 18 % angegeben. In einer prospektiven Studie messen sie bei Zwillingspaaren die ACE-Konzentration und stellen den II/DD-Polymorphismus fest. Bereits nach 6 Wochen unter einer Hochfettdiät ist die ACE-Konzentration deutlich erhöht, insbesondere die DD-Genotypen haben bereits zu

Beginn eine höhere ACE-Konzentration, die sich durch die Hochfettdiät sogar verdoppelt. Diese Studie zeigt, dass die ACE-Aktivität von äußeren Faktoren beeinflusst werden kann (Schüler et al. 2017). Die Regulierbarkeit der ACE-Werte war zum Zeitpunkt der Studie nicht bekannt. In weiteren Studien wäre ein anderer Parameter zur Messung der RAAS-Aktivität oder die Berücksichtigung von Einflussfaktoren sinnvoll.

Weitere Studien wären sicher wichtig und sinnvoll. Würde man einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Aktivität des lokalen RAAS und der Betazellfunktion feststellen, könnte man das Fortschreiten eines Diabetes Typ 1 durch eine medikamentöse RAAS-Blockade verzögern.

## **6.2 Zusammenhänge zwischen der ACE-Aktivität und dem Glukagon-Wert**

Auch wenn die vorliegenden Ergebnisse keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem lokalen RAAS und der Betazellreserve beim Typ 1 Diabetes belegen können, gibt es andere oben beschriebene Studien, die darauf Hinweise geben. Weitestgehend unbekannt ist der Mechanismus, wie das lokale RAAS seinen Einfluss nehmen könnte. Schon 1975 beschreiben Unger und Orci die bihormonelle Theorie beim Diabetes mellitus. Dabei spielt nicht nur der Insulinmangel eine Rolle in der Pathogenese sondern auch eine Hyperglukagonämie. Beide führen entweder über verminderten Glukoseverbrauch oder vermehrte Glukosebildung zum gleichen Ergebnis, nämlich zur Hyperglykämie (Unger, Orci, 1975).

H. Jahr et al. können durch Färbungen von Inselzell-Suspensionen eine vorwiegende Lokalisation von AT1R auf den glukagonproduzierenden Alphazellen nachweisen (Jahr H., Fischer B. et al. 2006). Regoli et al. können anhand ihrer Untersuchungen AT1R-mRNA von Angiotensinogen ebenfalls in den peripher der Inseln gelegenen Alphazellen nachweisen. Dies weist stark auf eine Expressierung des Angiotensinogens durch diese Zellen hin (Regoli et al. 2003). Wir wissen auch, dass Glukagon die Insulinausschüttung fördert und antagonistisch, also den Blutzucker erhöhend, zu diesem wirkt (Renz-Polster H., Krautzig S., Braun J. et al. 2004).

Es ist anhand der beschriebenen Erkenntnisse möglich, dass das lokale RAAS einen indirekten Einfluss auf die Betazellfunktion über die Alphazellen hat.

Diese Theorie wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestärkt. Bei 15 Patienten wurde nüchtern der Glukagon-Wert bestimmt und auf den Nüchternblutzucker bezogen. Hier wurde bei Patienten mit hohem ACE-Wert mit einer Signifikanz von  $p < 0,0001$  ein höheres Glukagon/BZ festgestellt als bei Patienten mit niedrigem ACE-Wert (siehe Abb 9). Eine hohe Aktivität des RAAS korreliert nach diesen Ergebnissen mit erhöhten Glukagonwerten. Vor allem in Verbindung zu den oben beschriebenen Ergebnissen zur Lokalisation der mRNA des AT1R und des Angiotensinogens, gibt dies Hinweise auf einen Einfluss des RAAS auf die Alphazellen.

Die Höhe des Glukagonwertes korreliert nicht mit der Höhe des C-Peptids im Verlauf der Erkrankung ( $p=0,36$ ) (siehe Abb 10).

Glukagon ist ein Hormon, das pulsatil in die Zirkulation abgegeben wird, es kommen in kurzer Zeit stärkere Schwankungen vor, daher ist es schwierig sich auf einen einzelnen Wert zu verlassen. Dies wurde versucht zu umgehen, indem der Glukagon-Wert nüchtern abgenommen wurde und auf den Nüchternblutzucker bezogen wurde.

In der vorliegenden Studie konnte ein Zusammenhang zwischen dem RAAS und der Funktion der Alphazellen bekräftigt werden, wobei der genaue Mechanismus weiterhin unklar bleibt. Dies animiert zu weiteren Untersuchungen, insbesondere im Hinblick auf neue Behandlungsoptionen, die die Regulierung der Glukagonfreisetzung oder die des lokalen RAAS im Fokus haben.

### **6.3 Verteilung der I/D-Polymorphismen**

Unterscheidet man die ACE-Werte zwischen verschiedenen Individuen, kann man große Unterschiede feststellen (Alhenc-Gelas F. et al. 1991 aus Sayed-Tabatabaci F.A. et al. 2005). B. Rigat et al. zeigen, dass ungefähr 50% der phänotypischen Variabilität der Plasmawerte zwischen verschiedenen Individuen dem I/D-Polymorphismus zugeschrieben werden können. Sie fanden heraus, dass die ACE-Werte bei DD-Polymorphismustypen annähernd doppelt so hoch sind wie bei II-Typen (Rigat B. et al. 1990). Beim ID-Typ können Werte zwischen denen der DD- und II-Typen festgestellt werden, was eine Kodominanz aufweist. Später wird auch gezeigt, dass der ID-Polymorphismus nicht nur die ACE-Werte im Plasma, sondern auch die im Gewebe beeinflusst (Costerousse O. et al. 1993; Danser A.H. et al. 1995 aus Sayed-Tabatabaci F.A. et al. 2005).

Im Rahmen dieser Studie wurde der I/D-Polymorphismus und dessen Verteilung bei 23 der 36 Typ 1 Diabetiker bestimmt. Der ID-Typ und der DD-Typ kommen je bei 10 (43,48%) gezeigt werden. Den II-Polymorphismus tragen nur drei (13,04%). Insgesamt kommt das D-Allel (ID+DD) bei 20 und somit fast allen (86,96 %) Typ 1 Diabetikern vor (siehe Tab 3 und Abb 1). Betrachtet man die Verteilung der Mittelwerte des ACE unterteilt nach dem Polymorphismus-Typ des Patienten, zeigt sich eine ähnliche Verteilung wie durch B. Rigat beschrieben. Die höchsten ACE-Mittelwerte finden sich beim DD-Typ (55,72 U/l) und die niedrigsten Werte beim II-Typ (26 U/l) (siehe Abb 2). Dies bestätigt sich in der Kontrollgruppe nicht völlig. Hier liegt der höchste ACE-Mittelwert im Bereich des ID-Polymorphismus mit 38 U/l. Der Mittelwert des DD-Typs liegt bei 34,8 U/l und wie bei den anderen Ergebnissen liegt der niedrigste Mittelwert mit 22 U/l im Bereich des II-Typs (siehe Abb 12). In der Kontrollgruppe wurde allerdings nur bei 10 Patienten ein ACE-Wert bestimmt, wobei nur ein Wert dem II-Polymorphismus zuzuordnen ist (siehe Abb 11).

Oben wurde bereits die Studie von Schüler et al. von 2017 beschrieben, die zeigt, dass die ACE-Werte von äußeren Faktoren beeinflusst werden können (Schüler et al. 2017). Dies kann erklären, weshalb in der vorliegenden Studie nur eine schwache Korrelation zwischen Polymorphismus und ACE-Wert vorlag.

Verschiedene Studien untersuchen ein erhöhtes Risiko für einen Diabetes Typ 2 unter dem DD-Typ und generell unter dem D-Allel (Niu et al. 2010, Feng Y. et al. 2002). Diese Studien ergeben eine höhere Anfälligkeit des DD-Typs und generell des D-Allels zur Entwicklung eines Typ 2 Diabetes. Das D-Allel ist in der vorliegenden Studie bei 86,96% der Patienten vorhanden (siehe Tab 3 und Abb 1). Ein erhöhtes Risiko für einen Typ 1 Diabetes unter diesem Polymorphismus kann nach diesem Ergebnis postuliert werden. Betrachtet man jedoch die gesunde Kontrollgruppe liegt eine ähnliche Verteilung des Polymorphismus vor. Insgesamt kommt das D-Allel (ID+DD) hier bei 10 und somit bei 83,3% vor. Den II-Polymorphismus tragen 2 (16,7%) (siehe Tab 12 und Abb 11). Die Gruppe der Diabetiker und der Gesunden ähnelt sich stark in der Verteilung der Polymorphismen und widerspricht einer möglichen Assoziation eines bestimmten Polymorphismus-Typs mit dem Diabetes mellitus Typ 1.

Betrachtet man die Verteilung der verschiedenen Polymorphismen-Typen in der Bevölkerung können Unterschiede in verschiedenen ethnischen Gruppen festgestellt werden. Zu dem Schluss kommen A. Halim Salem und M. A. Batzer durch ihre Untersuchungen in der arabischen Bevölkerung unter der Beobachtung

unterschiedlicher ethnischer Hintergründe (Halim Salem A., Batzer M.A. 2009). Eine europäische Herkunft lässt sich zwar bei den meisten unserer Patienten anhand der Nachnamen vermuten, lässt aber sicherlich keinen adäquaten Rückschluss auf die genaue Herkunft zu. Bei weiteren Studien muss dies unbedingt berücksichtigt werden. Bisher gibt es mehrere Untersuchungen in Zusammenhang mit dem Typ 2 Diabetes. Weitere Studien mit Typ 1 Diabetikern wären sicher interessant.



## 7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss des lokalen RAAS auf den Verlauf der Betazellreserve im Verlauf des Diabetes mellitus Typ 1 untersucht. Die Frage bestand darin, ob eine genetisch determiniert erhöhte ACE-Aktivität zu einer schnelleren Abnahme der Betazellfunktion im Laufe eines Typ 1 Diabetes führt.

Die Daten eines bestehenden Patientenkollektivs von 58 Typ 1 Diabetikern wurde im Rahmen dieser Studie ergänzt und retrospektiv untersucht. Nach Ausschluss der Patienten mit einer medikamentösen RAAS-Blockade und mit unvollständiger Datenreihe erfolgte die Auswertung mit 36 Patienten. Das Patientenkollektiv wurde nach unterschiedlicher Dauer der Erkrankung bis zur C-Peptid-Messung in Gruppen unterteilt. In allen Zeiträumen (<18 Monaten, <2 Jahren, <3 Jahren, <5 Jahren und <10 Jahren) kann kein signifikanter Zusammenhang der Höhe des C-Peptid-Wertes mit der Höhe des ACE-Wertes gezeigt werden. Anhand der Ergebnisse kann hier somit kein signifikanter Zusammenhang zwischen der ACE-Aktivität und dem Verlauf der Betazelldysfunktion festgestellt werden.

Eine wichtige Komponente in der Pathogenese des Diabetes mellitus stellt das Glukagon dar. Bei 15 der Patienten dieser Studie wurde der Zusammenhang der ACE-Aktivität mit dem auf den Nüchternblutzucker bezogenen Glukagonspiegel untersucht. Bei Patienten mit hohem ACE-Wert wird mit einer deutlichen Signifikanz von  $p < 0,0001$  ein höheres Glukagon/BZ festgestellt als bei Patienten mit niedrigem ACE-Wert. Die Höhe des Glukagonwertes korreliert nicht mit der Höhe des C-Peptids im Verlauf der Erkrankung. Das pankreatische RAAS scheint nach den vorliegenden Ergebnissen einen regulatorischen Einfluss auf den Glukagonspiegel der Alphazellen zu haben. Ein indirekter Einfluss des RAAS über den Glukagonspiegel auf die Betazellen wäre somit denkbar.

Im Rahmen dieser Studie wurde der, den ACE-Wert interindividuell beeinflussenden, I/D-Polymorphismen mittels PCR bestimmt. Insgesamt kommt das D-Allel (ID+DD) in der Gruppe der Patienten mit Typ 1 Diabetes bei 86,96 % und bei 83,3% der gesunden Kontrollgruppe vor. Ein Zusammenhang zwischen dem D-Allel und dem Auftreten des Diabetes mellitus Typ 1 kann durch diese Ergebnisse nicht bekräftigt werden.

## 8. Summary

In the present study the relationship between the activity of the local RAAS and the course of the betacell-reserve was examined. The central question concerned whether a high ACE-activity leads to a faster decrease in the betacell-reserve during the course of diabetes mellitus type 1. The data of an existing collective of 58 type 1 diabetics was drawn upon for the purposes of this study and was probed retrospectively. After excluding patients with a medicamentous RAAS-blockade and with an incomplete stream of data, the evaluation included 36 patients in total. This collective of patients was divided up into five groups according to the duration of the disease until c-peptide was measured. In all patient groups (<18 months, <2 years, <3years, <5years and <10years) no significant correlation between the height of the c-peptide and the ACE-level could be found. According to these results, no significant correlation between the ACE-activity and the course of the betacell-dysfunction could be shown.

An important role in the pathomechanism of diabetes mellitus plays glucagon. In 15 of the patients the relationship between the ACE-activity and the fasting glucose based glucagon level was examined. Patients with a higher ACE-level showed a significantly higher level of glucagon/fasting-glucose ( $p < 0,0001$ ) than those patients with a lower level. The glucagon-level did not correlate with the c-peptide-level. The pancreatic RAAS thus appears to have a regulatory influence on the glucagon-level of the alphacells. This could potentially indicate an indirect influence of the RAAS on betacells via the glucagon level.

As part of this study the I/D-polymorphism, which influences the ACE-level interindividually, was determined by PCR. The D-allele (ID+DD) was found in 86,96% of the patients with type 1 diabetes and in 83,3% of the healthy control group. This result couldn't indicate an association between the D-allele and the occurrence of diabetes mellitus type 1.

## 9. Abkürzungsverzeichnis

ACE	engl.: Angiotensin-converting-enzym
ADA	engl.: American Diabetes Association
Ang	Angiotensin
Anti-GAD-AK (GADA)	Glutaminsäuredecarboxylase-Antikörper
Anti-IA-2-AK	Tyrosinphosphatase IA-2- Antikörper
AT1-Antagonisten	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1-Antagonisten
ATP	Adenosintriphosphat
ATR1 +2	Angiotensin-Rezeptor Typ 1+2
BMI	engl.: Body-Mas-Index
bp	Basenpaare
BZ	Blutzucker
Ca 2+	Calcium
C-Peptid	engl.: Connecting peptide
CT	Computertomographie
CTGF	engl.: Connective-tissue-growth-factor
DCCT	engl.: Diabetes control and complications trial
DM	Diabetes mellitus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNOAP	Diabetisch-neuropathische Osteoarthropathie
DREAM	engl.: Diabetes Reduction Assessment with Ramipril and Rosiglitazone Medication
EDIC	engl.: Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA	engl.: Enzyme Immunoassay
EMBASE	engl.: Excerpta Medica Database
EST	engl.: Expressed sequence tags
ERK1/2	engl.: Extracellular signal-regulated kinases ½
GAD	Glutaminsäuredecarboxylase
GLUT4	Glukose-Transportprotein
GLP-1	engl.: Glucagon like peptide 1
HbA1c	Hämoglobin A1c

HLA	engl.: Human Leukocyte Antigen
HOMA-IR und -B	engl.: Homeostasis Model Assessment-Insulinresistenz und –Betazellfunktion
H <sub>2</sub> O	Wasser
IAA	Insulin-Autoantikörper
ICA	Inselzellantikörper
I/D	Insertion/Deletion
IE	Insulineinheit
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
INS	engl.: Insulin secreting
IP-10	engl.: Interferon-gamma inducible protein 10 kDa
IRS	Insulinrezeptor-Substrat
KE	Kohlenhydrateinheit
KHK	Koronare Herzkrankheit
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinasen
MAS-Rezeptor	Rezeptor für Ang 1-7
MCP-1	engl.: Monocyte chemoattractant protein-1
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHC	engl.: Major Histocompatibility Complex
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MR	Mineralcorticoidrezeptor
MRT	Magnetresonanztomographie
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NAVIGATOR	engl.: Nateglinide and Valsartan in Impaired Glucose Tolerance Outcomes Research
NBZ	Nüchternblutzucker
NF- $\kappa$ B	engl.: Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NGSP	engl.: National glycohemoglobin standardization program
NOD	engl.: Non-obese-diabetic
OGTT	Oraler Glukosetoleranztest
PAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCR	engl.: Polymerase chain reaction

PBK	Proteinkinase B
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKC $\beta$	Protein Kinase C $\beta$
PP	Pankreatisches Polypeptid
Rpm	engl.: Rounds per minute
PTPN2	Protein tyrosin phosphatase
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROS	engl.: Reactive oxygen species
TGF- $\beta$	engl.: Transforming growth factor- $\beta$
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
UCP2	engl.: Uncoupling protein 2
V	Vena
V	Volt
WHO	engl.: World Health Organisation
ZDF	engl.: Zucker diabetic fatty
Zn <sup>2+</sup>	Zink

## 10. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Tab 1:	Klassifikation des Diabetes mellitus nach Ätiologie (American Diabetes Association, 2011)
Tab 2:	Diagnosekriterien für einen Diabetes mellitus nach ADA (American Diabetes Association, 2011)
Tab 3:	Verteilung der I/D-Polymorphismen der Typ 1 Diabetiker, Gruppe 1a
Tab 4:	Verteilung von Alter (Jahre, Stand 2009), Diabetesdauer (Jahre, Stand 2009), HbA1c (%), BMI ( $\text{kg/m}^2$ ), C-Peptid 1 und 2 (ng/ml), C-pep/BZ, Diabetesdauer bis C-Peptid (Monate) und ACE (U/l) der Typ 1 Diabetiker, Gruppe 1a
Tab 5:	Verteilung des Geschlechts der Typ 1 Diabetiker, Gruppe 1a
Tab 6:	Verteilung der I/D-Polymorphismen der Gruppe 1b
Tab 7:	Verteilung von Alter (Jahre), Glucagon/BZ, Diabetesdauer (Jahre), HbA1c (%), BMI ( $\text{kg/m}^2$ ), C-Peptid (ng/ml), Dauer bis C-Peptid (Monat), ACE (U/l) der Gruppe 1b
Tab 8:	Verteilung des Geschlechtes der Gruppe 1b
Tab 9:	Verteilung von Alter (Jahre), HbA1c (%), BMI ( $\text{kg/m}^2$ ), C-Peptid (ng/ml), ACE (U/l) und Glukagonwerten (pg/ml) der Kontrollgruppe
Tab 10:	Verteilung des Geschlechtes der Kontrollgruppe
Tab 11:	Verteilung der Einnahme von ACE-Hemmern und AT1R-Blockern in der Kontrollgruppe
Tab 12:	Verteilung der I/D-Polymorphismen in der Kontrollgruppe
Tab 13:	Verteilung der I/D-Polymorphismen, Gruppe 1a/Kontrollgruppe
Abb 1:	Verteilung der Polymorphismen der Typ 1 Diabetiker, Gruppe 1a
Abb 2:	ACE-Mittelwerte (U/l) dem Polymorphismus zugeordnet der Gruppe 1a
Abb 3:	Diabetesdauer <18 Monate, Zusammenhang C-Peptid (ng/ml) und ACE (U/l)
Abb 4:	Diabetesdauer <2 Jahren, Zusammenhang C-Peptid (ng/ml) und ACE (U/l)
Abb 5:	Diabetesdauer <3 Jahren, Zusammenhang C-Peptid (ng/ml) und ACE (U/l)

- Abb 6: Diabetesdauer <5 Jahren, Zusammenhang C-Peptid (ng/ml) und ACE (U/l)
- Abb 7: Diabetesdauer <10 Jahren, Zusammenhang C-Peptid (ng/ml) und ACE (U/l)
- Abb 8: Verteilung der I/D-Polymorphismen der Gruppe 1b
- Abb 9: Glukagon/BZ und ACE (U/l)
- Abb 10: Glukagon/BZ und C-Peptid (ng/ml)
- Abb 11: Verteilung der Polymorphismen in der Kontrollgruppe
- Abb 12: ACE-Mittelwerte (U/l) der Kontrollgruppe dem Polymorphismus zugeordnet
- Abb 13: Kontrollgruppe: Polymorphismen und C-Peptid (ng/ml)
- Abb 14: Kontrollgruppe: Polymorphismen und Glukagon/BZ

# 11. Literaturverzeichnis

- Abuissa H., Jones P.G. et al. (2005) "Angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers for prevention of type 2 diabetes." J Am Coll Cardiol., 46, 821-826
- Alhenc-Gelas F., Richard J. et al. (1991)  
"Distribution of plasma angiotensin I-converting enzyme levels in healthy men: relationship to environmental and hormonal parameters." J Lab Clin Med., 117, 33-39
- Amaya K., Ohta T. et al. (2004) "Angiotensin II activates MAP kinase and NF-kB through angiotensin II type 1 receptor in human pancreatic cancer cells." Int J Oncol., 4, 849-856
- American Diabetes Association (2011)  
"Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus." Diabetes Care, 34, 562-569
- Bagger J.I., Knop F.K. et al. (2011) "Glucagon antagonism as a potential therapeutic target in type 2 diabetes." Diabetes, Obesity and Metabolism, 13, 965-971
- Balon T.W., Nadler J.L. et al. (1997) "Evidence that nitric oxides increase glucose transport in skeletal muscle." J Appl Physiol., 82, 359-363
- Barton M., Carmona R. et al. (2003) "Obesity-associated activation of angiotensin and endothelin in the cardiovascular system." Ing J Biochem Cell Biol., 35, 826-837
- Boright A.P., Paterson A.D. et al. (2005)  
"Genetic variation at the ACE gene is associated with persistent microalbuminuria and severe nephropathy in type 1 diabetes: the DCCT/EDIC Genetics Study." Diabetes, 54, 1238-1244
- Böhm B.O., Dreyer M. et al. (2011) "S3-Leitlinie Therapie des Typ-1-Diabetes." Deutsche Diabetes Gesellschaft.  
[http://www.deutschediabetesgesellschaft.de/fileadmin/Redakteur/Leitlinien/Evidenzbasierte\\_Leitlinie\\_n/AktualisierungTherapieTyp1Diabetes\\_1\\_20120319\\_TL.pdf](http://www.deutschediabetesgesellschaft.de/fileadmin/Redakteur/Leitlinien/Evidenzbasierte_Leitlinie_n/AktualisierungTherapieTyp1Diabetes_1_20120319_TL.pdf), 1-115
- Bözkut Ö., de Boer A. et al. (2009) "Renin-angiotensin system polymorphism and the association between use of angiotensin II receptor blockers or angiotensin-converting enzyme inhibitors and the risk of diabetes", Journal



of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System, 10,  
101-108

- Briones A.M., Nguyen Dinh Cat A. et al. (2012)  
"Adipocytes produce aldosterone through calcineurin-dependent signaling pathways implications in diabetes mellitus-associated obesity and vascular dysfunction." Hypertension, 59, 1069-1078
- Broom O.J., Widjaya B. et al. (2009)  
"Mitogen activated protein kinases: a role in inflammation bowel disease?" Clin. Exp. Immunol., 158(3), 272-280
- Carlsson P.O., Berne C. et al. (1998) "Angiotensin II and the endocrine pancreas: acts on islet blood flow and insulin secretion and in acute pancreatitis." Diabetologia, 41, 127-133
- Carlsson P.O. (2001) "The Renin-Angiotensin System in the Endocrine Pancreas," J Pancreas (Online), 2(1), 26-32
- Crackower M.A., Sarao A. et al. (2002)  
"Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function." Nature, 417(6891), 822-828
- Chappell M.C. et al. (1991) "Evidence of an intrinsic angiotensin system in the canine pancreas", Journal of Hypertension, 9, 751-159
- Chipitsyna G., Gong Q. et al. (2007) "Induction of Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression by Angiotensin II in the Pancreatic Islets and  $\beta$ -Cells." Endocrinology, 148(5), 2198-2208
- Chu K.Y., Leung P.S. (2009) "Angiotensin II in type 2 diabetes mellitus", Curr Protein Pept Sci, 10, 75-84
- Chu K.Y., Tung L. et al. (2006) "Angiotensin II Type 1 Receptor Blockade Improves  $\beta$ -Cell Function and Glucose Tolerance in a Mouse Model of Type 2 Diabetes." Diabetes, 55, 367-374
- Chu K.Y., Leung P.S. (2007) "Angiotensin II Type 1 receptor antagonism mediates uncoupling protein 2-driven oxidative stress and ameliorates pancreatic islet beta-cell function in young type 2 diabetic mice." Antioxid Redox Signal, 9(7), 869-878

- Coates D. (2003) "The angiotensin converting enzyme (ACE)", The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 35, 769-773
- Costerousse O., Allegrini J. et al. (1993) "Angiotensin I-converting enzyme in human circulation mononuclear cells: genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes." Biochem J., 290, 33-40
- Danilov S., Jaspard E. et al. (1994) "Structure function analysis of angiotensin I converting enzyme using monoclonal-antibodies-selective-inhibition of the amino-terminal active-site." Journal of Biological Chemistry, 269(43), 26806-26814
- Danser A.H., Schalekamp M.A. et al. (1995) "Angiotensin-converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion/insertion polymorphism." Circulation, 92, 1387-1388
- Davies J.L., Kawaguchi Y. et al. (1994) "A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes." Nature, 371(6493), 130-136
- De Gasparo M., Catt K.J. et al. (2000) "International Union of Pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors." Pharmacol Reviews, 52, 415-472
- Dörner K. (2003) "Klinische Chemie und Hämatologie." Thieme, 5. Auflage
- Donath M. Y., Størling J. et al. (2003) "Inflammatory mediators and islet  $\beta$ -cell failure: a link between type 1 and type 2 diabetes." J Mol Med., 81, 445-470
- Donoghue M., Hsieh F. et al. (2000) "A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9." Circ Res., 87, 1-9
- DREAM (Diabetes reduction assessment with ramipril rosiglitazone) (2006) "Effect of rosiglitazone on the frequency of diabetes in patients with impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose: a randomised controlled trial." Lancet, 368, 1096-1105

- Efanova I.B., Zaitsev Z. et al. (1998) "Glucose and tolbutamide induce apoptosis in pancreatic beta-cells. A process dependent on intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration." J Biol Chem., 273, 33501-33507
- El-Dorri H.A., Pickett C.B. et al. (1982) "Tissue-specific expression of mRNAs for dipeptidyl carboxypeptidase isoenzymes." Proc Natl Acad Sci USA, 79, 4295-4297
- Elliott W.J., Meyer P.M. et al. (2007) "Incident diabetes in clinical trials of antihypertensive drugs a network meta-analysis." Lancet, 369, 201-207
- Engeli S., Schling P. et al. (2003) "The adipose tissue renin-angiotensin-aldosterone system role in metabolic syndrome." Int J Biochem Cell Biol., 35, 807-825
- Evans J.L., Goldfine I.D. et al. (2003) "Are oxidative stress-activated signalling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction?" Diabetes, 52, 1-8
- Federici M., Hribal M. et al. (2001) "High glucose causes apoptosis in cultured human pancreatic islets of Langerhans: a potential role for regulation of specific Bcl family genes toward an apoptotic cell death program." Diabetes, 50, 1290-1301
- Ferrario C.M. (1998) "Angiotension (1-7) and antihypertensive mechanisms." J Nephrol., 11, 278-283
- Ferrario C.M., Chappell M.C. (2004) "Novel angiotensin peptides." Cell Mol.Life Sci., 61, 2720-2727
- Feng Y., Niu T. et al. (2002) "Insertion/Deletion polymorphism of the ACE Gene is associated with type 2 diabetes." Diabetes, 51, 1986-1988
- Fink A.S., Wang Y. et al. (2002) "Angiotensin II evokes calcium-mediated signalling events in isolated dog pancreatic epithelial cells." Pancreas, 25, 290-295
- Fleming I., Kohlstedt K. et al. (2006) "The tissue renin-angiotensin system and intracellular signalling." Current Opinion in Nephrology and Hypertension, 15, 8-13
- Frantz E.D.C., Crespo-Mascarenhas C. (2013)

- "Renin-Angiotensin System Blockers Protect Pancreatic Islets against Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance in Mice." PLoS ONE, 8(7) e67192
- Golenhofen et al. (2000) "Physiologie heute." Urban&Fischer, 2. Auflage
- Goodfriend T.L., Egan B.M. et al. (1999) "Plasma aldosterone, plasma lipoproteins, obesity and insulin resistance in humans." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 60, 401-405
- Gray Ch., Chipitsyna G. et al. (2007) "Transcriptional Regulation of Angiotensin Type 1 Receptor by Angiotensin II And Glucose In The Pancreatic Islets And Beta Cells." American Diabetes Association. Diabetes Pro. (online), Abstract Nr: 1705-P
- Gromada J., Franklin I. et al. (2007) "Alpha-cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains." Endocr Rev., 28, 84-116
- Hackenthal E., Paul M. et al. (1990) "Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion." Physiological Reviews, 70, 1067-1116
- Hayden M.R., Sowers J.R. (2007) "Isletopathy in Type 2 diabetes mellitus: implications of islet RAS, islet fibrosis, islet amyloid, remodeling, and oxidative stress." Antioxid Redox Signal, 9(7), 891-910
- Henriksen E.J., Jacob S. et al. (1999) "ACE inhibition and glucose transport in insulin-resistant muscle, roles of bradykinin and nitric oxide." Am J Physiol., 277, 332-336
- Henriksen E.J., Jacob S. et al. (2003) "Angiotensin converting enzyme inhibitors and modulation of skeletal muscle insulin resistance." Diabetes Obes Metab., 5, 214-222
- Herold G. et al. (2016) "Innere Medizin"
- Higashiura K., Ura N. et al. (1999) "Effect of an angiotensin II receptor antagonist, candesartan, on insulin resistance and pressor

- mechanisms in essential hypertension." J Hum Hypertens., 13, 71-74
- Ho S.H, Hong O.K. "High glucose increases extracellular matrix production in pancreatic stellate cells by activating the renin-angiotensin system." J Cell Biochem., 98(2), 343-355
- Ip S.P., Leung P.S. et al. (2003) "Saralasin, a nonspecific angiotensin II receptor antagonist, attenuates oxidative stress and tissue injury in cerulein-induced acute pancreatitis." Pancreas, 26, 224-229
- Ip S.P., Leung P.S., Kwan P.C. et al. (2003) "Changes of angiotensin-converting enzyme activity in the pancreas of chronic hypoxia and acute pancreatitis." Int J Biochem Cell Biol., 35, 944-954
- Jahr H., Fischer B. et al. (2006) "Nachweis von ACE und AT-II-Rezeptoren im endokrinen Pankreas von Mensch, Maus und Ratte." Diabetologie, 1, 85 Abstract 133
- Jandeleit-Dahm K.A.M., Tikellis C. et al. (2005) "Why blockade of the renin-angiotensin system reduces the incidence of new-onset diabetes." Journal of Hypertension, 23, 463-473
- Janke J., Engeli S. et al. (2002) "Mature adipocytes inhibit in vitro differentiation of human pre-adipocytes via angiotensin type 1 receptors." Diabetes, 51, 1699-1707
- Juan C.C., Chien Y. et al. (2005) "Angiotensin II enhances insulin sensitivity in vitro and in vivo." Endocrinology, 146, 2246-2254
- Karow Th., Lang-Roth R. (2013) "Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie" Thomas Karow
- Kennon B., Connell J.M. (2000) "ACE Gene Polymorphism and Diabetic Complications: Is there a connection?" BioDrugs, 14(2), 73-81
- Kerner W., Brückel J. et al. (2004) "Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus, Evidenzbasierte Leitlinie DDG"
- Keymeulen B., Vanderneulebrouke E. et al. (2005) "Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes." N Engl J Med., 352(25), 2598-2608

- Ko S-H., Hong O-K et al. (2006) "High glucose Increases Extracellular Matrix Production in Pancreatic Stellate Cells by Activating the Renin-Angiotensin System." Journal of Cellular Biochemistry, 98, 343-355
- Kuno A., Yamada T. et al. (2003) "Angiotensin-converting enzyme inhibitor attenuates pancreatic inflammation and fibrosis in male Wistar Bon/Kobori rats." Gastroenterology, 124, 1010-1019
- Kutlu B., Darville M.I. et al. (2003) "Molecular regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression in pancreatic  $\beta$ -cells." Diabetes, 2, 348-355
- Lam K.Y., Leung P.S. (2002) "Regulation and expression of a renin-angiotensin system in human pancreas and pancreatic endocrine tumors." European Journal of Endocrinology, 146, 567-572
- Lau T. et al. (2004) "Evidence for a local angiotensin-generating system and dose-dependent inhibition of glucose-stimulated insulin release by angiotensin II in isolated pancreatic islets." Diabetologia, 47, 240-248
- Laube H. et al. (1998) "Untersuchungen zur A-Zellfunktion bei Typ-1 und Typ-2 Diabetes mellitus in Abhängigkeit von Alter und Diabetesdauer."
- Lawecki J., Symonides-Lawecka A. et al. (1976) "Serum insulin, pancreatic glucagon and growth hormone levels in response to intravenous infusion of L-arginine in patients with recently detected juvenile diabetes." Pol Med Sci. Hist. Bull., 15(2), 177-182
- Leung K.K., Leung P.S. et al. (2008) "Effects of Hyperglycemia on Angiotensin II Receptor Type 1 Expression and Insulin Secretion in an INS-1E Pancreatic Beta-Cell Line." JOP. J Pancreas (online), 9(3), 290-299
- Leung P.S., Chan H.C. et al. (1997) "Localisation of angiotensin II receptor subtypes AT1 and AT2 in the pancreas of rodents." Journal of Endocrinology, 153, 269-274
- Leung P.S., Chan H.C. et al. (1998) "Immunohistochemical localization of angiotensin II in the mouse pancreas." Histochemical Journal, 30, 21-25

- Leung P.S., Chan W.P. et al. (1999) "Expression and localization of the renin-angiotensin system in the rat pancreas." Journal of Endocrinology, 160, 13-19
- Leung P.S. (2004) "The peptide hormone angiotensin II: its new functions in tissues and organs." Curr Protein Pept Sci., 5(4), 267-273
- Leung P.S. (2007) "The physiology of a local renin-angiotensin system in the pancreas." J Physiol., 580(Pt1):3, 1-7
- Leung P.S. (2007) "Mechanisms of protective effects induced by blockade of the renin-angiotensin system: novel role of the pancreatic islet angiotensin-generating system in Type 2 diabetes." Diabetic Medicine, 24, 110-116
- Leung P.S., Carlsson P.O. (2005) "Pancreatic Islet Renin Angiotensin System." Pancreas, 30, 293-298
- Leung P.S., Carlsson P.O. (2001) "Tissue renin-angiotensin system: its expression, localization, regulation and potential role in the pancreas." Journal of Molecular Endocrinology, 26, 155-164
- Levitsky L.L., Madhusmita M. (2015) "Epidemiology, presentation, and diagnosis of type 1 diabetes mellitus in children and adolescents." UpToDate®, 1-19
- Lupi R., Del Guerra S. et al. (2006) "The direct effects of the angiotensin-converting enzyme inhibitors, zoenoprilat and enalaprilat, on isolated human pancreatic islets." European Journal of Endocrinology, 154, 355-361
- Luther J.M., Brown N.J. (2011) "The renin-angiotensin-aldosterone system and glucose homeostasis." Trends in Pharmacological Sciences, 32(12), 734-739
- Munoz M.C., Giani J.F. et al. (2009) "Long-term treatment with an angiotensin II receptor blocker decreases adipocyte size and improves insulin signalling in Zucker rats." J Hypertens., 27(12), 2409-2420
- McMurrey J.J. et al. (2010) "Effect of valsartan on the incidence of diabetes and cardiovascular events." N Engl J. Med., 362, 1477-1490
- Müller W.A., G.R. Faloona et al. (1973)

- "Hyperglucagonemia in diabetic ketoacidosis-its prevalence and significance." Am J Med, 54, 52-57
- Mutschler E. (1996) "Arzneimittelwirkungen." Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 7. Auflage
- Moleda P., Makowska L. et al. (2005) "I/D polymorphism of angiotensin I converting enzyme gene an insulin resistance and some parameters of metabolic syndrome in patients with type 2 diabetes." Pol Arch Med Wewn., 114(6), 1172-1179
- Moon J.S., Won K.Ch. (2015) "Pancreatic  $\alpha$ -Cell Dysfunction in Type 2 Diabetes: Old Kids on the Block." Diabetes Metab J., 39, 1-9
- NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC) (2016) "Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 44 million participants." Lancet (online), 387(10027), 1513–1530
- Niu W., Qi Y. et al. (2010) "Angiotensin converting enzyme D allele is associated with an increased risk of type 2 diabetes: evidence from a meta-analysis." Endocrine Journal, 57(5), 431-438
- Paul M., Mehr A.P. et al. (2006) "Physiology of local-angiotensin systems." Physiol Rev, 86, 747-803
- Peach M. (1977) "Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanism of action." Physiol Rev., 57, 113-370
- Pietropaolo M. (2015) "Pathogenesis of type 1 diabetes mellitus." UpToDate®, 1-20
- Ramracheya R.D., Muller D.S. et al. (2006) "Direct regulation of insulin secretion by angiotensin II in human islets of Langerhans." Diabetologica, 49, 321-331
- Reid I.A., Morris B.J. et al. (1978) "The renin-angiotensin system." Annual Review of Physiology, 40, 377-410
- Regoli M., Bendayan M. et al. (2003) "Angiotensinogen localization and secretion in the rat pancreas." Journal of Endocrinology, 179(1), 81-90



- Reinehr R., Zoller S. et al. (2004) "Effects of Angiotensin II on pancreatic stellate cells" Pancreas, 28, 129-137
- Renz-Polster H., Krautzig S., Braun J. et al. (2004) "Basislehrbuch Innere Medizin." Urban&Fischer, 3. Auflage
- Rigat B., Hubert C. et al. (1990) "An Insertion/Deletion Polymorphism in the Angiotensin I-converting Enzyme Gene Accounting for Hal the Variance of Serum Enzyme Levels." J Clin Invest., 86, 1343-1346
- Sadoshima J. (2000) "Cytokine actions of angiotensin II." Circ. Res., 86, 1187-1189
- Salem A.H., Batzer M.A. (2009) "High frequency of the D allele of the angiotensin-converting enzyme gene in Arabic populations." BMC Res Notes, 8(2), 99
- Sayed-Tabatabaei F.A., Oostra B.A. et al. (2006) "ACE Polymorphism." Circulation Research, 98, 1123-1133
- Scheen A.J. (2004) "Renin-angiotensin system inhibition prevents type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized clinical trials." Diabetes Metab., 30, 487-496
- Sharma A.M., Janke J. et al. (2002) "Angiotensin blockade prevents type 2 diabetes by formation of fat cells." Hypertension, 40, 609-611
- Schiebler Theodor H., Schmidt Walter (Hrsg.) (2002) "Anatomie", Springer, 8. Auflage
- Schüler R., Osterhoff M.A. et al. (2017) "High-Saturated-Fat Diet Increases Circulating Angiotensin-Converting Enzyme, Which is Enhanced by the rs4343 Polymorphism Defining Persons at Risk of Nutrient-Dependent Increases of Blood Pressure" J Am Heart Assoc., 6:e004465. DOI 10.1161/JAHA.116.004465.
- Shao J.Q., Iwashita N. et al. (2007) "Angiotensin II receptor blocker provides pancreatic beta-cell protection independent of blood pressure lowering in diabetic db/db mice." Acta Pharmacol Sin., 28(2), 246-257
- So W.Y., Ma R.C. et al. (2006) "Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition in type 2, diabetic patients-interaction with ACE

- insertion/deletion polymorphism." Kidney Int., 69 (8), 1293-1295
- Speckmann E.-J. et al. (2008) "Repetitorium Physiologie." Urban&Fischer Verlag/Elsevier GmbH
- Stanziola L. et al. (1999) "Effect of chronic angiotensin converting enzyme inhibition on angiotensin I and bradykinin metabolism in rats." Am. J. Hypertens., 12, 1021-1029
- Tahmasebi M., Puddefoot J.R. et al. (1999) "The tissue renin-angiotensin system in human pancreas." Journal of Endocrinology, 161, 317-322
- Tikellis C., Wookey P.J. et al. (2004) "Improved Islet Morphology after Blockade of the Renin-Angiotensin System in the ZDF Rat." Diabetes, 53, 989-997
- Tikellis C., Cooper M.E. et al. (2006) "Role of the renin-angiotensin system in the endocrine pancreas: Implications for the development of diabetes." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 38, 737-751
- Tipnis S.R., Hooper N.M. et al. (2000) "A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase." J Biol Chem., 275, 33238-33243
- Tomiyama H., Kushiro T. et al. (1994) "Kinins contribute to the improvement of insulin sensitivity during treatment with angiotensin-converting enzyme inhibitor." Hypertension, 23, 450-455
- Touyz R.M. et al. (2002) "Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II." Circ. Res., 90, 1205-1213
- Tsang S.W., Ip S.P., Wong T.P., Leung P.S. et al. (2003) "Differential effects of saralasin and ramiprilat, the inhibitors of renin-angiotensin system on cerulein-induced acute pancreatitis." Regul Pept., 111, 47-53

- Tsang S.W., Ip S.P., Leung P.S. et al. (2004) "Prophylactic and therapeutic treatments with AT1 and AT2 receptor antagonists and their effects on changes in the severity of pancreatitis." Int J Biochem Cell Biol., 36, 330-339
- Tsang S.W., Cheng C.H.K. et al. (2004) "The role of pancreatic renin-angiotensin system in acinar digestive enzyme secretion and in acute pancreatitis." Regul Pept., 119, 213-219
- Tuomilehto J. (2013) "The emerging global epidemic of type 1 diabetes." Current Diabetes Reports, 13(6), 795-804
- Turner A.J., Hooper N.M. (2002) "The angiotensin converting enzyme gene family: genomics and pharmacology." Trends in Pharmacological Sciences, 23(4), 177-183
- UK Prospective Diabetes Study Group (1998) "Efficacy of atenolol and captopril in reducing risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS." BMJ, 317, 713-720
- Underwood P.C., Adler G.K. (2013) "The Renin Angiotensin Aldosterone System and Insulin Resistance in Humans." Curr Hypertens Rep., 15, 59-70
- Unger R.H., Orci L. (1975) "The essential role of glucagon in the pathogenesis of diabetes mellitus." Lancet, 1(7897), 14-6
- Wang L., Leung P.S. (2013) "The Role of renin-angiotensin system in cellular differentiation: Implications in pancreatic islet cell development and islet transplantation." Molecular and Cellular Endocrinology, 381, 261-271
- Watts M., Ha J. et al. (2016) "Paracrine regulation of glucagon secretion: the  $\beta/\alpha/\delta$  model." Am J Physiol Endocrinol Metab., 310, 597-611
- Welsch U., Deller Th. (2002) "Lehrbuch Histologie." Elsevier, 2. Auflage
- © World Health Organization (2016) "Global report on diabetes." WHO Library Cataloguing-in-Publication Data
- Wong T.P., Ho K.Y. et al. (2012) "Upregulation of ACE2-ANG-(1-7)-Mas axis in jejunal enterocytes of type 1 diabetic rats: implications for glucose transport." American

Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 303(5), 669-681

- Zeyda M., Stulnig T.M. (2009) "Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance-A Mini-Review." Gerontology, 55, 379-386
- Zhang Z., Chunyan L. et al. (2013) "Improved Glucose-Stimulated Insulin Secretion by Selective Intraislet Inhibition of Angiotensin II Type 1 Receptor Expression in Isolated Islets of db/db Mice." International Journal of Endocrinology, Article ID 319586, 1-10

## 12. Puplicationsverzeichnis

45. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft, 2010

- Abstract A-274-0003-00185 und Poster:

Hat das pankreatische Renin-Angiotensin-Aldosteron-System einen Einfluss auf die Beta-Zellreserve bei erwachsenen Typ 1 Diabetikern ?

Autoren : A. Wöhrle, A. Sinder, M. Eckhard, T. Linn, P. Hardt, R.G. Bretzel, B. Fischer

## 13. Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## 14. Danksagung

Ein großes Dankeschön gehört meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med Hardt für seine zuverlässige und schnelle Betreuung.

Nicht genug danken kann ich Frau Dr. Britta Fischer. Sie investierte viel Zeit und Arbeit in dieses Projekt und unterstützte mich bei allen Problemen und Fragen. Mit viel Engagement ließ sie mich von ihrer wissenschaftlichen Erfahrung und ihrer diabetologischen Fachkompetenz profitieren.

Für die Hilfe bei dem Thema der Statistik möchte ich mich bei Dr. Gerrit Eichner des Mathematischen Instituts der Justus-Liebig-Universität für seine kompetente und hilfsbereite Unterstützung bedanken.

Nicht zu vergessen sind meine Eltern, die mir stets zur Seite stehen und die mir dabei helfen jegliche Träume und Vorhaben zu verwirklichen.